



**Nair da Conceição Coutinho de Oliveira Braga**

# **Valorização de subprodutos de *Castanea sativa*: casca e ouriço**

Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade  
Especialidade em Água e Alimentos

Trabalho desenvolvido sobre a orientação de:

**Prof. Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira**

**Mestre Francisca Pinto Lisboa Martins Rodrigues**

**Outubro 2014**

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta Dissertação/Tese.

Este trabalho foi financiado pela União Europeia (fundos FEDER através do COMPETE) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), através de projeto de Pest-C / EQB / LA0006 / 2013. Contou também com o apoio financeiro da União Europeia (fundos FEDER), no âmbito do QREN, através do Projeto NORTE-07-0124-FEDER-000069.

## Agradecimentos

No percurso do trabalho que agora termina participaram pessoas que, pelos seus contributos, tornaram possível a conclusão deste mestrado e às quais pretendo expressar a minha gratidão.

À Professora Doutora Maria Beatriz Oliveira pela sua dedicada orientação, pelo apoio, disponibilidade e compreensão e cuja profunda experiência e saber muito valorizaram esta tese.

À Francisca Rodrigues por toda a sua ajuda e atenção na realização deste trabalho, conhecimento transmitido e valiosa revisão crítica desta tese.

À Doutora Joana Santos pela sua disponibilidade na realização dos ensaios da análise alimentar.

À Mestra Filipa Pimentel por partilhar os seus conhecimentos metodológicos na determinação dos aminoácidos e vitamina E.

Ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial à Anabela Costa, por toda a ajuda e simpatia.

Ao Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior Agrária de Ponte de Lima em especial à Doutora Ana Paula Vale e à Técnica Maria Rocha pelo acolhimento e pela cooperação.

À Doutora Ana Palmeira-de-Oliveira pela ajuda nos ensaios microbiológicos.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e deram motivação para ultrapassar todas as dificuldades ao longo destes dois anos. Em especial ao Luís Filipe pela preciosa ajuda na execução das figuras desta dissertação.

O maior agradecimento é dirigido aos meus pais que estão sempre presentes com o seu amor, incentivando e proporcionando meios para poder progredir.

Ao meu querido irmão que é para mim uma inspiração e exemplo de força.

Por fim ao Vasco por toda a compreensão e amor que nos une.

## Resumo

A indústria do processamento da castanha utiliza, principalmente, este fruto para fins alimentares. Embora sejam gerados muitos subprodutos, a grande maioria não tem qualquer utilização. A valorização dos subprodutos (casca e ouriço) pode conduzir a novos ingredientes com qualidades biológicas interessantes, visando a sua utilização em várias indústrias, nomeadamente alimentar, cosmética e farmacêutica.

O estudo desenvolvido nesta dissertação visou valorizar os subprodutos resultantes do processamento da castanha. O estudo foi desenvolvido em duas matrizes resultantes do processamento da castanha (casca e ouriço), pertencentes a três regiões produtoras de Portugal (Minho, Beira-Alta e Trás-os-Montes). Foi avaliada a atividade antioxidante de três extratos (alcoólico, hidroalcoólico e aquoso) obtidos das várias amostras. O extrato hidroalcoólico foi o que forneceu resultados mais promissores, tendo sido o escolhido para a realização do restante trabalho.

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelos ensaios do DPPH e FRAP. Foram ainda determinados os teores de Fenóis Totais e Flavonóides nas mesmas amostras. Todas elas demonstraram elevado potencial antioxidante, no entanto, a casca de Trás-os-Montes foi a amostra que forneceu valores mais elevados em todos os ensaios (DPPH,  $EC_{50}$   $31,80 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ ; fenólicos totais  $796,8 \pm 1,07 \text{ mg eq. Ácido Gálico /g extrato seco}$ )

Na caracterização química dos dois subprodutos das três regiões em estudo, determinaram-se a humidade, proteína total e perfil de aminoácidos, cinzas, fibra dietética, gordura total e vitamina E. As amostras revelaram baixo teor de gordura ( $< 0,1\%$ ), elevado teor de fibra ( $>40\%$ ) e um teor proteico que variou entre 2 e 3 mg/100g. A arginina e a leucina foram os aminoácidos presentes em maior quantidade (7 e 4 mg/g). As amostras de Trás-os-Montes foram as que forneceram valores superiores de vitamina E, 962,65 mg/g na casca e 624,08 mg/g no ouriço.

Este trabalho evidenciou potencial para o desenvolvimento de novos produtos.

**Palavras-Chave:** *Castanea sativa*, composição nutricional, extratos alcoólicos, casca de castanha, ouriço

## Abstract

*Castanea sativa* Mill. processing industry uses the fruit but a large amount of by-products are generated without any visible application. The study of *Castanea sativa* Mill. by-products (shell and burs), can lead to the development of new products with interesting biological qualities, that can be used in different industries such as cosmetic, pharmaceutical or food. The work developed in this thesis aims the valorization of agro-wastes derived from chestnut processing.

The study was conducted in two arrays (shell and burs), from three chestnut producing regions of Portugal (Minho, Beira Alta and Trás-os-Montes). The antioxidant potential of three extracts from the samples (alcoholic, hydroalcoholic and aqueous) was evaluated. The hydroalcoholic extract showed the most promising results, being chosen for the remaining work.

The antioxidant capacity was determined by DPPH and FRAP assays. Flavonoids and Total Phenol Content were also evaluated. All samples presented a high antioxidant potential, however, Trás-os-Montes shell presented the highest values, TPC ( $796.8 \pm 1.07$  mg eq. gallic acid / g dry extract) and  $EC_{50}$  for DPPH ( $31.80 \pm 1.13$  mg / mL), respectively.

Chemical characterization was performed by determining the total fat, moisture, ash, dietary fiber, total protein, amino acid and vitamin E profile. The samples showed low fat content ( $<0.1\%$ ), high fiber content ( $> 40\%$ ) and a protein content with values ranging from (2 and 3 mg / 100g). The highest vitamin E values were obtained for Trás-os-Montes bur and shell (624.08 and 962.65 mg / g dry basis, respectively). The arginine and leucine were the amino acids present in higher amounts, with values ranging from 4 to 7 mg / g dry basis.

This study showed the high potential of shell and bur for new products development.

**Keywords:** *Castanea sativa*, nutritional composition, alcoholic extracts, shell, bur, extract, composition, sustainability

## Publicações e comunicações

1. **Nair Braga**, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application, *Natural Product Research*, 29(1): 1-18, 2014.
2. **Nair Braga**, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, Evaluation of the antioxidant potential of *Castanea sativa* by-products: shell and bur, XII Encontro de Química dos Alimentos, September 2014, Lisboa, Portugal.
3. **Nair Braga**, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, *Castanea sativa* by-products: a new sustainable sources of bioactive compounds, 7º Encontro da Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP), February 2013, Porto, Portugal.
4. **Nair Braga**, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, Evaluation of the antioxidant potential of *Castanea sativa* by-products: shell and bur, 12th Meeting on Food Chemistry: Bridging Traditional and Novel Foods: Composition, Structure and Functionality, 324-327.

# Índice

Agradecimentos .....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Publicações e comunicações .....	VII
Índice .....	VIII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução .....	1
1.1 <i>Castanea sativa</i> Mill. ....	2
1.1.1 Composição da castanha .....	3
1.1.2 Processamento da Castanha .....	4
1.1.3 Novas Aplicações da Castanha.....	5
1.2 Sustentabilidade.....	6
1.2.1 Conceito de Sustentabilidade .....	6
1.2.2 Sustentabilidade Ambiental, Económica e Social .....	7
1.2.3 Sustentabilidade da indústria processadora de castanha .....	9
1.2.4 Compostos Fenólicos e Subprodutos .....	10
1.3. Subprodutos da <i>Castanea sativa</i> Mill.....	11
1.3.1 Folhas .....	11
1.3.2 Cascas .....	14
1.3.3 Ouriços.....	16



2. Material e Métodos.....	18
2.2 Recolha e Tratamento das Amostras.....	19
2.3 Preparação dos Extratos (cascas e ouriços).....	20
2.4 Determinação do Teor Total de Compostos Fenólicos.....	20
2.5 Determinação do Teor de Flavonoides .....	20
2.6 Atividade Antioxidante .....	21
2.6.1. Determinação da Capacidade Antioxidante.....	21
2.6.2. Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro .....	21
2.7 Análise Química.....	22
2.7.1 Determinação do Teor de Humidade.....	22
2.7.2 Determinação do Teor de Cinzas .....	22
2.7.3 Determinação do Teor de Proteína.....	23
2.7.4 Determinação do Teor de Gordura Total .....	23
2.7.5 Determinação do Teor de Fibra Dietética .....	23
2.7.6 Determinação do Perfil de Hidratos de Carbono.....	24
2.8 Determinação do Teor de Vitamina E .....	24
2.8.1 Preparação das Amostras .....	24
2.8.2 Análise Cromatográfica .....	25
2.9 Determinação do Perfil de Aminoácidos .....	25
2.9.1 Hidrólise .....	25
2.9.2 Derivatização .....	25
2.9.3 Análise Cromatográfica .....	26
2.10 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	26

2.10.1 Estirpes de Microrganismos .....	26
2.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por ensaio de diluição .....	27
2.11 Análise Estatística.....	27
3. Resultados e Discussão .....	29
3.1. Escolha do Solvente .....	30
3.2 Determinação do Teor Total de Fenólicos .....	32
3.3 Determinação do Teor de Flavonoides .....	33
3.4 Atividade Antioxidante .....	34
3.4.1 Determinação da Capacidade Antioxidante .....	34
3.4.2 Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP).....	35
3.5 Correlação de atividades .....	36
3.5.1 Comparação entre os vários constituintes da <i>Castanea sativa Mill.</i> .....	39
3.6 Análise Química.....	40
3.6.1 Caracterização do Perfil Nutricional.....	40
3.6.2 Fibra Dietética .....	41
3.7 Vitamina E .....	42
3.8 Aminoácidos .....	44
3.9 Atividade Antimicrobiana .....	47
3.10 Análise das diferenças entre as regiões avaliadas.....	48
4. Conclusão .....	50
5. Referências Bibliográficas .....	52

## Lista de Figuras

Figura 1 - Comparação da produção anual de castanha no período entre 2009 e 2013, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE). .....	2
Figura 2 – Produção mundial de castanha (toneladas) a nível mundial, durante o ano de 2012, segundo dados da FAO (3). .....	3
Figura 3 - Constituição macrovisual de <i>Castanea sativa</i> . .....	3
Figura 4 - Sistematização das etapas de processamento da castanha. ....	5
Figura 5 - Subprodutos da castanha resultantes do seu processamento.....	9
Figura 6 – Aspeto macroscópico dos diferentes extratos, respetivamente, hidroalcoólico, alcoólico e aquoso, da esquerda para a direita. ....	30
Figura 7 - Placa com 96 poços após a análise do DPPH, comprovando a diferença de cores após a reação.....	34
Figura 8 - Aspeto macroscópico das amostras após avaliação do teor de humidade. ....	41
Figura 9 – Cromatograma referente aos aminoácidos analisados no extrato da casca do Minho. ....	45
Figura 10 - Alterações climáticas e influências na desertificação dos solos (Fonte: Comissão Nacional de Coordenação de Combate à Desertificação (2012).....	48

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Conteúdo fenólico total (mg eq. Ácido Gálico /g extrato seco) em cascas e ouriços do Minho. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	30
Tabela 2 - Rendimento de extração obtido para as diferentes amostras. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=2).....	31
Tabela 3 - Conteúdo fenólico total (mg eq. Ácido Gálico /g extrato seco) em casca e ouriços entre as diferentes zonas de estudo. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	32
Tabela 4 - Teor de flavonóides totais (mg eq. Catequina /g extrato seco) em casca e ouriços das diferentes zonas de estudo. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	33
Tabela 5 - Valores de EC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos nos ensaios de atividade antioxidante para os diferentes subprodutos das zonas avaliadas. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	34
Tabela 6 - Atividade antioxidante dos diferentes extratos hidroalcoólicos de casca e ouriço baseado na sua capacidade de reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ao estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ....	36
Tabela 7 – Valores de Correlação de Pearson ( $R^2$ ) obtidos para os ensaios.....	36
Tabela 8 - Valores de CTF obtidos para diferentes subprodutos. ....	37
Tabela 9 – Comparação entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos vários constituintes da <i>C. sativa</i> Mill. ....	39
Tabela 10 - Valores nutricionais das amostras analisadas. Os valores (g/100g de amostra) são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	40
Tabela 11 – Valor total de Vitamina E e dos diferentes vitâmeros das amostras de casca e ouriço das regiões estudadas. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=2). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Valores expressos em mg/100g de amostra. ....	43
Tabela 12 - Teor em aminoácidos (mg/g de extrato seco) dos diferentes extratos hidroalcoólicos. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=2). ....	46

## **Lista de Abreviaturas**

ATP- adenosina trifosfacto

ACR - atividade captadora de radicais

ADN - ácido desoxirribonucleico

ARN - ácido ribonucleico

BHT - hidroxitolueno butilado

CFT - conteúdo fenólico total

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

ERA - espécies reativas de azoto

EC<sub>50</sub> - concentração de extrato que conduz a 50% de atividade captadora de radicais

EAG - equivalentes de ácido gálico

ERE - espécies reativas de enxofre

ERO - espécies reativas de oxigénio

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA - Food and Drug Administration

GSH – Glutathiona na forma reduzida

MUF - melamina, ureia e formaldeído

PF - fenol com formaldeído

STZ - Streptozotocin

UF - ureia com formaldeído

UV - ultravioleta

GRAS - generally recognized as safe

3R - Reutilizar / Remanufaturar / Reciclar

# 1. Introdução

## 1.1 *Castanea sativa* Mill.

A *Castanea sativa* Mill. é uma espécie que pertence à família Fagaceae, encontrando-se maioritariamente presente em países do sul da Europa e da Ásia. Em Portugal a plantação de castanheiros representa uma área de aproximadamente 35 000 hectares, com uma produção anual de cerca 24,7 mil toneladas de castanha (1). Trás-os-Montes é a principal região produtora, com mais de 75% de toda a quota nacional, sendo uma importante fonte de rendimento para toda a região (1). A produção nacional de castanha entre os anos 2009 e 2013 encontra-se representada na Figura 1.

### PRODUÇÃO DE CASTANHA NO PERÍODO 2009-2013 (Toneladas)

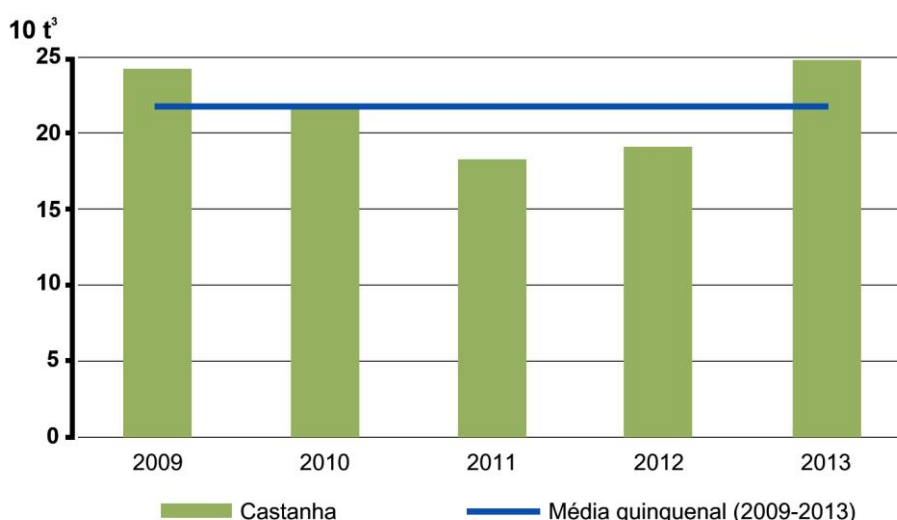


Figura 1 - Comparação da produção anual de castanha no período entre 2009 e 2013, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE).

A produção de castanha tem como principal destino a exportação, nomeadamente para países como Espanha, Itália e França, estando o restante produto destinado ao mercado interno (2).

De modo a preservar o património genético e a alta qualidade da castanha, foram criadas quatro regiões com denominação de origem protegida, designadas Terra Fria, Padrela, Soutos da Lapa e Marvão.

A produção internacional de castanha é bastante significativa, estando distribuída por vários continentes. Na China abunda a *Castanea molissima*, enquanto na República da Coreia podemos encontrar a *Castanea crenata*, sendo ambas de porte mais pequeno

que a *C sativa*. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), no ano de 2012 a China foi o maior produtor mundial de castanha (1 650 000 t), seguida pela República da Coreia.

A Figura 2 apresenta a distribuição da produção de castanha em diversos países durante o ano de 2012, não existindo ainda dados oficiais para o ano de 2013.



Figura 2 – Produção mundial de castanha (toneladas) a nível mundial, durante o ano de 2012, segundo dados da FAO (3).

### 1.1.1 Composição da castanha

A castanha é composta pelo fruto, pela casca (interna e externa) e está protegida pelo ouriço, conforme se pode observar na Figura 3.



Figura 3 - Constituição macrovisual de *Castanea sativa*.



O fruto encontra-se na sua fase de maturação durante a época do Outono, sendo muito apreciado nos países do Mediterrâneo (4). A castanha pode ser consumida ao natural ou cozinhada, sendo igualmente possível, encontrar castanhas congeladas no mercado, durante todo o ano (4). A preparação da castanha provoca-lhe alterações a nível sensorial e nutricional, melhorando as suas características organoléticas (sabor e textura) e nutricionais, assim como o seu prazo de validade (4-5). A assadura é o processo que melhor preserva as qualidades nutricionais da castanha, elevando o seu perfil de minerais e polifenóis (6). Cozinhada, é uma boa fonte de ácidos orgânicos e polifenóis, apresentando um baixo teor de gordura (7).

De acordo com o seu perfil nutricional, a castanha é considerada uma importante fonte de energia, devido ao elevado teor em amido, hidratos de carbono e sais minerais, principalmente, fósforo, potássio e ferro (5, 8). Este conteúdo deve, no entanto, ser tido em conta, por determinados consumidores, caso dos doentes com insuficiência renal (9). O teor mineral é de extrema importância na manutenção dos processos biológicos do organismo, funcionando os minerais como cofactores enzimáticos e intervindo nos processos de digestão e absorção (4, 7). A castanha é constituída por ácidos gordos polinsaturados, como o ácido oleico, linoleico e palmítico, associados à prevenção de doenças cardiovasculares (10). A vitamina E, presente na castanha na forma de  $\alpha$ -tocoferol, atua como antioxidante prevenindo a peroxidação lipídica pelas espécies reativas de oxigénio (ERO) e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (8, 11). Pode também ser usada como marcador de autenticidade, permitindo a identificação de diferentes variedades de castanha, de acordo com o seu perfil de tocoferóis e tocotrienóis (12).

Diferentes factores, como condições ambientais, armazenamento e variabilidade sazonal, podem influenciar a composição nutricional e a qualidade das castanhas (13). A sua qualidade é avaliada por factores físicos, como a cor, a forma e o tamanho, os quais são bastante importantes para a aceitabilidade por parte dos consumidores (14).

### **1.1.2 Processamento da Castanha**

A indústria de processamento da castanha envolve várias fases e um vasto número de pessoas. Durante todo o processo é gerada uma elevada quantidade de resíduos de produção, correspondendo só a casca a cerca de 20% do peso total da castanha.

O ouriço e a casca são geralmente usados como biocombustível, pelo que, a sua valorização, poderá conduzir à maior sustentabilidade do processo de produção de castanha (15). Na Figura 2 podemos visualizar o processamento da castanha desde a sua apanha até ao destino final.

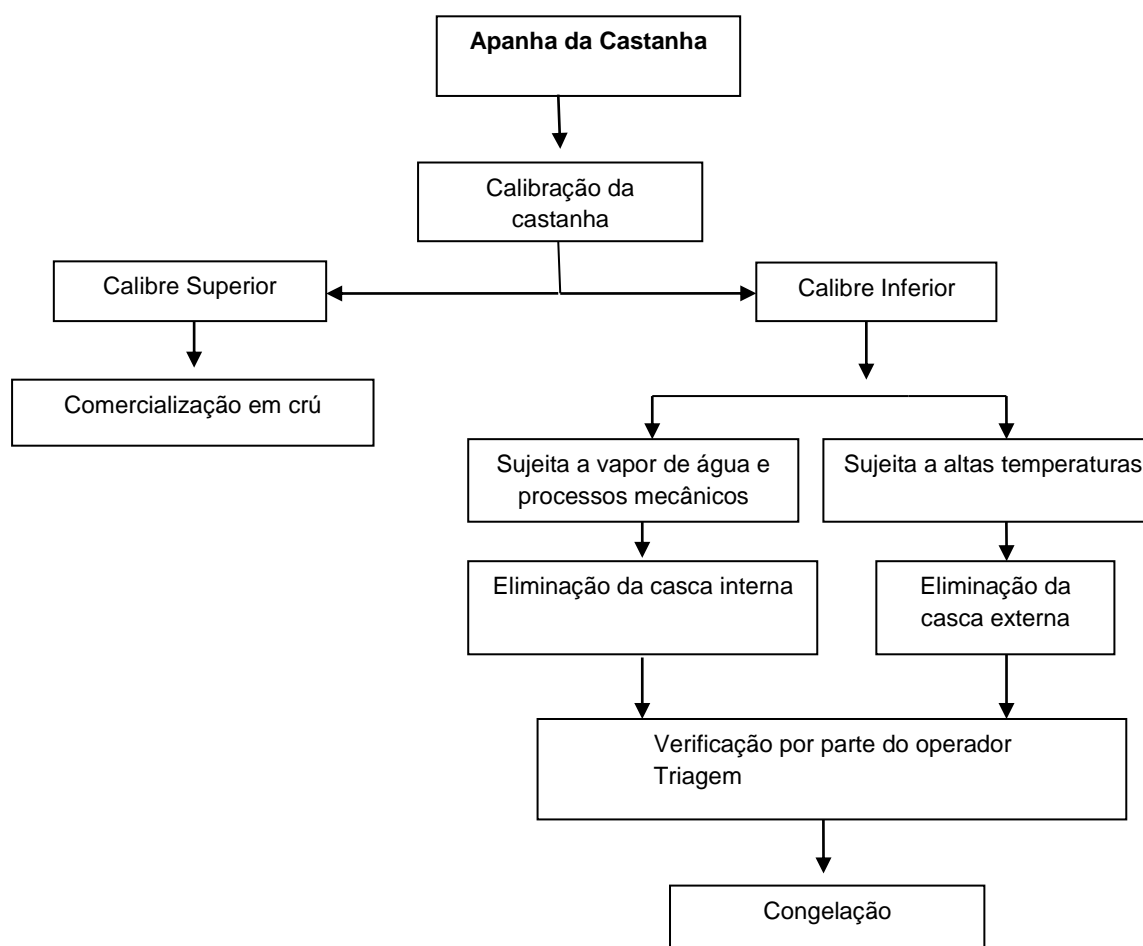


Figura 4 - Sistematização das etapas de processamento da castanha.

### 1.1.3 Novas Aplicações da Castanha

A castanha é um fruto isento de glúten, factor de elevada importância no caso da doença celíaca. Atualmente, já é possível encontrar no mercado pão sem glúten derivado da flor da castanha, estando variados produtos semelhantes em fase de desenvolvimento (16). A flor da castanha possui igualmente propriedades antitumorais e antimicrobianas, fazendo prever futuras aplicações tanto na indústria farmacêutica como na indústria alimentar (17).

Foram descritos efeitos benéficos para a saúde provenientes do consumo de castanha, como é o caso das fibras que ajudam a melhorar o trânsito intestinal (18-19). Ao nível da indústria alimentar, o amido constituinte da castanha, pode ter novas aplicações. Por exemplo, como possui uma boa consistência associada a um elevado teor de amilose com características fortes e elásticas, pode ser utilizado para conferir melhorias na textura das massas (20).

Por outro lado, a madeira do castanheiro pode ser utilizada na indústria vinícola para a construção de barris (21-22). Nela detetaram elevados níveis de compostos fenólicos, voláteis e aldeídos, principalmente derivados da vanilina, os quais podem ser usados no processo de envelhecimento do vinho, conferindo-lhe características particulares, factor diferenciador para a aceitação por parte do consumidor final (22).

Sánchez-Martín *et al.* avaliaram igualmente a castanha como novo adsorvente para corantes catiónicos, tendo obtido resultados muito promissores para o meio ambiente (23).

De um modo geral, pode concluir-se que o processamento da castanha pode vir a originar novos produtos de valor acrescentado para a saúde, gerando um aumento dos lucros para a indústria alimentar. Simultaneamente, o meio ambiente é tido em conta, procurando sempre trabalhar numa base de sustentabilidade e de química verde.

O principal objetivo desta dissertação foi propor novas soluções para o reaproveitamento dos resíduos da produção da castanha, nomeadamente cascas e ouriços.

## **1.2 Sustentabilidade**

### **1.2.1 Conceito de Sustentabilidade**

O conceito de desenvolvimento sustentável foi pela primeira vez explorado em 1987, no Relatório de Brundtland, onde foi definido como a capacidade de satisfazer as necessidades do presente, sem comprometer as necessidades das gerações futuras (24). No entanto, esta problemática só começou a ser, seriamente, discutida na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente, realizada em 1972, em Estocolmo. Como resultado, foram reunidos 26 princípios que marcaram o início da conciliação entre as práticas de preservação ambiental e o desenvolvimento. Desta forma, concluiu-se que,

*"Os recursos naturais da terra incluindo o ar, a água, a terra, a flora, a fauna e, especialmente, amostras representativas dos ecossistemas naturais devem ser preservados em benefício das gerações presentes e futuras, mediante uma cuidadosa planificação ou ordenamento."* (25)

Recentemente, o relatório de Avaliação Ecosistémica do Milénio das Nações Unidas verificou precisamente o contrário. Cerca de 60% dos ecossistemas estão em contínua degradação, incluindo a água pura, a pesca, a purificação do ar, a regulação climática local e regional, estando ainda sujeitos a ameaças naturais e epidemias. Foi consensual que o meio ambiente está sob clara ameaça (26).

Esta degradação começa a implicar custos que atingem diversas classes sociais, contribuindo para o aumento das desigualdades, bem como para conflitos sociais.

Na conferência realizada em Junho de 2012 no Rio de Janeiro (Rio +20), que contou com a participação de vários chefes de Estado, foi reiterado o compromisso dos países para o apoio ao desenvolvimento sustentável, de forma a assegurar um futuro para o planeta e para as gerações presentes e futuras. A erradicação da pobreza foi definida como o maior desafio mundial e como um requisito indispensável para o desenvolvimento sustentável.

Face a esta problemática, a União Europeia desenvolveu um modelo de sustentabilidade, denominado "Modelo de Sustentabilidade de Três Pilares" onde descreve o desenvolvimento sustentável como só atingível quando englobados o desenvolvimento ambiental, económico e social, numa relação de simbiose.

As políticas Europeias têm três principais objetivos " mais valor - menos impactos - melhores alternativas " (27).

### **1.2.2 Sustentabilidade Ambiental, Económica e Social**

Os consumidores estão cada vez mais exigentes em relação aos produtos que consomem. O tipo de produção, os fertilizantes utilizados, o tratamento a que os animais estão sujeitos, assim como o impacto ambiental que resulta da produção em massa, são factores cada vez mais determinantes na escolha ou não, do produto pelo consumidor final.

Os recursos naturais não são uma fonte inesgotável e estão a ser, continuamente, degradados. A diminuição de matérias-primas, face ao crescente aumento populacional, leva a que seja crucial a procura de alternativas que consigam dar respostas a esta problemática. O uso eficiente dos recursos materiais e energéticos pode assim ser o caminho para a sustentabilidade.

Muitos dos ecossistemas estão a ser destruídos em consequência de medidas tomadas para aumentar, por exemplo, a quantidade de alimentos disponível no mercado. Estima-se que até 2050, seja impossível suprimir as necessidades alimentares de toda a população mundial. Factores como mudanças climáticas, problemas de poluição, industrialização da agricultura, elevado processamento dos alimentos, bem como o aumento do consumo da proteína animal na dieta ou o fosso crescente entre classes sociais, intervêm diretamente na sustentabilidade (28).

Torna-se assim impreterível que as indústrias assumam a responsabilidade de desenvolver produtos sustentáveis e implementem sistemas de produção mais limpos, tendo por base a política dos 3R (Reutilizar / Remanufaturar / Reciclar), reduzindo o impacto negativo sobre o meio ambiente (29).

A reutilização de produtos, ou a valorização de subprodutos presentemente considerados lixo, podem ser de extrema importância para reduzir o impacto negativo no ambiente e ainda proporcionar novas valências económicas para as diferentes indústrias.

O sector agroalimentar deve envolver todas as partes interessadas (agricultores, industriais de processamento, políticos, comerciantes, consumidores, investidores), de modo a cooperarem entre si, com o objetivo de desenvolver e implementar processos de produção agroalimentares sustentáveis e a utilização de produtos não prejudiciais para o ambiente (30). Medidas de melhoria podem ser adotadas na agricultura, nas fases de adubação, irrigação e acondicionamento (30).

Devem igualmente ser aplicadas, políticas internacionais que visem encontrar soluções a curto e longo prazo para uma sustentabilidade ambiental, de modo a assegurar recursos alimentares e energéticos para as populações vindouras.

### 1.2.3 Sustentabilidade da indústria processadora de castanha

A indústria de processamento de castanha utiliza principalmente o fruto (castanha) para o fim alimentar, sendo os outros produtos vegetais (folhas, cascas e ouriços) considerados resíduos. A Figura 5 representa os subprodutos em estudo que resultam do processamento da castanha.



Figura 5 - Subprodutos da castanha resultantes do seu processamento.

Tal como mencionado anteriormente, estes subprodutos são usados como combustível ou são simplesmente considerados lixo, não lhes sendo atribuída qualquer outra aplicação. A valorização dos subprodutos da castanha pode ser conseguida com o desenvolvimento de novos produtos. Vários estudos mostraram que os subprodutos da castanha são uma boa fonte de compostos fenólicos, com elevada atividade biológica, principalmente capacidade antioxidante (31-32). Neste sentido, os extratos dos subprodutos da castanha podem contribuir para a sustentabilidade desta indústria, sendo necessário o desenvolvimento de métodos de baixo custo, capazes de extrair compostos com atividade biológica passíveis de serem utilizados em diferentes industriais, diminuindo assim o impacto negativo destes resíduos sobre o meio ambiente.

A indústria poderá assim alcançar benefícios através de uma gestão sustentável, acompanhada de um melhor desempenho económico e ambiental, com base no uso eficiente de recursos, materiais e energia (33).

### 1.2.4 Compostos Fenólicos e Subprodutos

Os polifenóis estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os metabolitos secundários mais abundantes nas plantas, intervindo diretamente no stresse oxidativo (34). O stresse oxidativo ocorre quando o balanço entre a produção e a eliminação de ERO, espécies reativas de azoto (ERA), e espécies reativas de enxofre (ERE) é comprometido, levando a um excesso de produção de espécies oxidativas (35). Os principais alvos de espécies pró-oxidantes são as proteínas, as moléculas do ácido desoxirribonucleico (ADN) e do ácido ribonucleico (ARN), açúcares e lípidos (35-36).

Os polifenóis estão associados a propriedades benéficas para a saúde, atuando como agentes antitumorais, antialérgicos, antiagregantes plaquetários, anti-isquémicos e anti-inflamatórios devido às suas capacidades antioxidantes (37-39). O efeito inibidor na carcinogénese e no desenvolvimento tumoral pode ser atingido através de diferentes mecanismos, tais como interação com membranas e recetores intracelulares, modulação de cascatas de sinalização, interação com as enzimas elementares envolvidas na promoção de tumores e metástases, interação com oncoproteínas e interações diretas ou indiretas com ácidos nucleicos e nucleoproteínas (40).

Os consumidores preferem, de um modo geral, compostos naturais capazes de substituir os sintéticos, associados a efeitos tóxicos e cancerígenos. Os ácidos fenólicos são um destes exemplos, sendo investigados como novos antioxidantes primários para a prevenção de processos oxidativos, visando a eventual utilização na indústria alimentar (41-42).

A história comprova o longo uso de *C. sativa* em preparações medicinais. As infusões de folhas de castanheiro foram durante muitos anos, utilizadas para tratar a tosse, a diarreia e a doença reumática, enquanto a casca da castanha tinha a sua principal aplicação como combustível (43-44).

Estudos recentes efetuados em subprodutos da castanha concluíram que todas as amostras apresentam elevadas quantidades de compostos fenólicos, quando extraídos com água, com teores decrescentes na seguinte ordem de conteúdos: casca externa, casca interna, folhas e flores (31, 45-46).

Os autores descrevem uma relação direta entre a atividade antioxidante dos resíduos e o aumento da sua concentração em fenóis (31). Mesmo em concentrações baixas de extrato, foram verificados resultados promissores (31).

De entre os diversos compostos fenólicos encontrados na composição dos extratos destacam-se os ácidos fenólicos (elágico e gálico), os flavonóides (rutina, quercetina e apigenina) e os taninos, todos com elevado potencial antioxidante (32, 43, 47).

### **1.3. Subprodutos da *Castanea sativa* Mill**

#### **1.3.1 Folhas**

As folhas da castanha, outrora usadas para a produção de infusões utilizadas no tratamento de variados problemas de saúde, vêm a sua valorização reforçada devido à presença de compostos bioativos na sua composição.

##### **1.3.1.1 Efeito protetor na diabetes**

O stresse oxidativo está na origem e no desenvolvimento de muitas doenças. Por exemplo, a progressão da diabetes, pode estar relacionada com o excesso da produção de espécies reativas, relacionadas com uma diminuição das concentrações de glutathione na sua forma reduzida (glutathione, GSH) (48).

O stresse oxidativo desempenha um papel ativo no desenvolvimento de resistência à insulina e tolerância à glucose, conduzindo a uma disfunção das células  $\beta$  do pâncreas e à disfunção mitocondrial (49). Surge assim a ideia de que os suplementos contendo antioxidantes na sua composição podem ser utilizados como terapia adjuvante para o controlo do açúcar no sangue em pacientes diabéticos (50).

As células  $\beta$  do pâncreas estão envolvidas no desenvolvimento da diabetes e a sua falha pode implicar o agravamento da doença (51).

Lenzen *et al.* verificaram a atividade de agentes antioxidantes no controlo do desenvolvimento da diabetes (51). O Streptozotocin (STZ), normalmente, conduz à geração de ERO e de quantidades tóxicas de óxido nítrico, as quais causam danos no ADN e morte de células  $\beta$  do pâncreas (51). Este agente diabetogénico foi misturado com um extrato etanólico de folhas de *C. sativa*, verificando-se a diminuição nos níveis de GSH. Este factor pode ser o motivo para o aumento da peroxidação lipídica verificada na diabetes, após indução pelo STZ (48).



As propriedades antioxidantes apresentadas pelo extrato de folhas de *C. sativa* tiveram bons resultados na prevenção do stresse oxidativo em células pancreáticas de ratos (52). Os extratos foram capazes de aumentar a viabilidade celular após o tratamento com STZ, inibindo a peroxidação lipídica (52).

Em células tratadas com STZ, juntamente com os extratos de castanha, verificou-se um aumento nas concentrações de GSH, o que comprova o efeito positivo destes extratos na prevenção da diabetes (52).

### **1.3.1.2 Atividade Antibacteriana e Alelopática**

As plantas são produtoras de moléculas bioativas com capacidade de interagir com outros organismos no meio ambiente. Esta interação pode levar à inibição do crescimento de bactérias e fungos, característica da atividade antibacteriana, ou modular o desenvolvimento de outros vegetais, demonstrando uma atividade alelopática (53).

O desenvolvimento de resistência aos agentes antibacterianos existentes e a escassez de bons agentes antifúngicos motiva a pesquisa de novas moléculas com efeitos terapêuticos. Várias áreas estão sob investigação, incluindo a junção do ARN mensageiro nos fungos e a síntese de ADN bacteriano (54).

Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas em resposta a infeções microbianas, podendo atuar como agentes antimicrobianos naturais (55). A sua presença pode ser importante, por exemplo, para aumentar o prazo de validade dos alimentos, inibindo o crescimento de microrganismos patogénicos (56). A sua forma de ação pode passar pela atuação direta sobre a membrana ou a parede celular dos microrganismos (56). A interação com as proteínas de membrana bacteriana, por meio de ligações de hidrogénio, através dos seus grupos hidroxilo, pode provocar alterações na permeabilidade da membrana, levando à destruição celular e consequentemente à eliminação do microrganismo (57).

A eficácia da utilização de compostos fenólicos no crescimento de bactérias (gram positivas e gram negativas) e bolores foi testada através da realização de ensaios microbianos (58).

A atividade antibacteriana e alelopática foram avaliadas numa fração solúvel de acetato de etilo do extrato aquoso de folhas de *C. sativa* (59). Este extrato foi testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas demonstrando atividade antibacteriana contra sete estirpes bacterianas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e

*Enterobacter cloacae*. As bactérias *E.aerogenes* e *S.aureus* foram as mais sensíveis (59). A concentração mais baixa, capaz de inibir o crescimento bacteriano foi de 62,5µg / ml (59).

A quercetina e a rutina foram os flavonóides mais ativos nos ensaios antibacterianos (59). A quercetina atua pela inibição das girases através da interação com moléculas de ADN e com a ligação das girases à adenosina trifosfacto (ATP) (60).

A rutina pode promover seletivamente a clivagem da topoisomerase-IV com o ADN, induzindo a resposta das *E. coli* (58). Esta atividade pode levar a uma inibição do crescimento das células de *E. coli*, uma vez que a topoisomerase IV é essencial para a sobrevivência celular (61). Deste modo, estes extratos podem vir a ter um enorme potencial para utilização na indústria farmacêutica ou alimentar.

### **1.3.1.3 Aplicação Tópica**

A pele é constantemente exposta a diferentes radiações. A radiação ultravioleta (UV) da luz solar pode causar danos a curto e longo prazo (62). O envelhecimento é um processo natural da pele que está estreitamente relacionado com o stresse oxidativo (63). Os efeitos adversos visíveis após algumas horas de exposição ao sol são a vermelhidão e o ardor, devido à libertação de substâncias que causam vasodilatação e eritema. Os efeitos a longo prazo passam, essencialmente, pelo fotoenvelhecimento, perda de elasticidade, aparecimento de manchas e, numa situação extrema, cancro da pele (64). As radiações UV provocam danos na pele devido à geração de ERO e ERA, as quais interagem com proteínas, lípidos e ADN, resultando em modificações estruturais e funcionais no tecido cutâneo (62, 65). As radiações UV e as ERO estão envolvidas em doenças de pele, como eritema, cancro, psoríase, acne, vasculite cutânea, dermatite de contato alérgica e fotoenvelhecimento (62, 66-68). Os compostos fenólicos são considerados os inibidores mais eficazes contra a dermatite de contacto (69). Estes compostos podem atuar através de mecanismos não-específicos como atividade antioxidante, mas também através de mecanismos específicos, como a inibição dos mediadores envolvidos na resposta imunitária, demonstrando propriedades anti-inflamatórias (69-70).

O fotoenvelhecimento pode ser prevenido pela proteção da pele contra os ERO, utilizando antioxidantes (71) A aplicação tópica de antioxidantes, como a vitamina C e vitamina E, tem provado ser eficaz na proteção da pele contra danos provocados pelas radiações (72).

Um estudo recente avaliou a utilização de extratos etanólicos de *C. sativa* para futuras aplicações tópicas (71, 73). Foi verificada uma forte absorção a 280 nm, o que faz prever uma possível eficácia deste extrato na prevenção de danos induzidos por radiações UV (73). O extrato era composto, principalmente, por compostos fenólicos, como o ácido clorogénico, o ácido elágico, a rutina e a quercetina (73).

Um ensaio *in vivo* realizado através de *patch* teste em 20 voluntários humanos revelou resultados muito promissores (73). De acordo com Almeida *et al.*, as condições ideais para a estabilidade da formulação tópica com um extrato hidroalcoólico de folhas de *C. sativa* é o armazenamento a 20°C (73).

Um outro estudo caracterizou uma formulação tópica contendo um extrato etanólico de folhas de *C. sativa* (71). A estabilidade física, microbiológica e funcional para 6 meses de armazenamento foi confirmada para valores de temperatura de 20°C e 40°C (71). O aumento da temperatura para 40°C causou algumas modificações nas propriedades reológicas da formulação e a diminuição da eficácia antioxidante do extrato (71). Este facto pode estar relacionado com as mudanças no teor de rutina, a qual é instável a temperaturas mais elevadas (71). Além disso, sendo a rutina o principal composto fenólico do extrato, a diminuição da propriedade antioxidante está relacionada com este aumento de temperatura.

A formulação tópica contendo o extrato de folha de *C. sativa* provou ser segura e estável, podendo vir a ser usada na indústria cosmética para a prevenção e tratamento de disfunções mediadas pelo stresse oxidativo e fotoenvelhecimento.

### **1.3.2 Cascas**

As cascas da castanha, além de poderem ser utilizadas como biocombustível, podem ver o seu potencial de aplicação aumentado devido à existência de compostos fenólicos na sua composição, os quais conferem características antioxidantes, bem como a potencialidade de outro tipo de aplicações.

#### **1.3.2.1 Potencial uso como adsorvente de metais**

O uso de subprodutos ou resíduos provenientes de operações industriais e da agricultura como bioadsorventes, para a remoção de metais pesados, tóxicos das correntes aquosas, está em fase de estudo (74-76). Metais como o cobre, chumbo, zinco e cádmio, são facilmente encontrados em efluentes industriais (77). A sua toxicidade,

bioacumulação e persistência na natureza são fatores de preocupação (69). É assim de extrema importância a sua remoção das águas residuais para uma futura separação, recuperação e reutilização (76).

A bioadsorção é vista como uma nova alternativa às tecnologias convencionais existentes para a remoção de contaminantes metálicos de efluentes aquosos (78). Esta tecnologia mostrou grandes vantagens quando comparada com os tratamentos convencionais. A elevada eficiência, o baixo custo, a regeneração de bioadsorventes e a possibilidade de recuperação de metais aquosos foram algumas das vantagens demonstradas (78).

De um ponto de vista sustentável, esta nova utilização de resíduos agroindustriais, pode conduzir a uma melhoria ambiental e a uma diminuição dos custos associados à bioacumulação de metais pesados na água e no solo.

A casca da castanha demonstrou ter um elevado potencial para ser usada como adsorvente de metais pesados (44). Esta foi considerada uma boa opção para a remoção de iões tóxicos de águas residuais com a mesma eficiência e menores custos, comparativamente com outros adsorventes disponíveis no mercado (79).

Vázquez *et al.* utilizaram um pré-tratamento com formaldeído em cascas de castanha e verificaram o seu efeito sobre a influência da concentração inicial do catião, da temperatura e do pH, de modo a otimizar a remoção de iões chumbo, cobre e zinco, a partir de uma solução aquosa (44). A casca da castanha foi pré-tratada com formaldeído em meio ácido para polimerizar e imobilizar os compostos fenólicos solúveis em água (44). A capacidade máxima da adsorção foi obtida com os iões de chumbo e a ordem de afinidade dos iões para a casca foi:  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$  (44).

Provavelmente, os grupos funcionais da casca envolvidos na captação de metais foram o carboxilo, o carbonilo, o grupo amino e os grupos alcoólicos (44). Além disso, verificou-se um aumento da capacidade de adsorção com o aumento da temperatura e do pH (44).

### **1.3.2.2 Potencial uso como substituto do fenol na formulação de colas**

A indústria madeireira utiliza colas compostas pela mistura de fenol com formaldeído (PF), ureia com formaldeído (UF) e melamina, ureia e formaldeído (MUF) (80).

O produto agregante PF é o mais utilizado devido ao seu elevado tempo de resistência à água, tornando-o adequado para aplicações exteriores, proporcionando uma alta resistência à humidade e uma boa estabilidade à temperatura (81). Os principais problemas no uso deste tipo de produtos (PF) são a composição em materiais não renováveis (combustíveis fósseis) e os custos do fenol (81-82). A utilização de produtos naturais, tais como taninos e lignina como substitutos de fenol em formulações, estão a ser estudados, com base na sua similaridade estrutural e elevada reatividade, apresentando benefícios económicos e ambientais (83-84). Com efeito, os taninos da casca, sob diferentes condições, podem ser utilizados como potenciais substitutos do fenol (15).

### **1.3.2.3 Potencial aplicação na Indústria do curtimento de peles**

O tratamento de águas residuais do curtimento das peles representa um dos maiores problemas na indústria do couro devido ao difícil controlo da poluição e dos seus custos (84). Cerca de 90% deste processo recorre a sais de crómio (III), sendo este considerado um resíduo perigoso para o meio ambiente (85-87). No processo de curtimento das peles pode evitar-se a sua degradação estabilizando a estrutura de colagénio (85-86). Esta estabilização, feita pelo crómio, tem tido alguns avanços na procura de alternativas.

Os taninos vegetais são compostos naturais considerados como uma opção mais vantajosa para o meio ambiente, adequada para substituir os sais de crómio, conferindo ainda diferentes propriedades organoléticas e químicas aos couros (87-88). Vasquez *et al.* extraíram os taninos da casca da castanha, utilizando água e diferentes soluções aquosas alcalinas (15). O rendimento da extração obtido para a casca da castanha (entre 8,7 e 49,4%), atingiu os valores descritos para taninos já comercializados (42-43%) (15). Os taninos extraídos eram do tipo condensado e as massas moleculares médias adequadas à utilização na indústria de peles (15).

### **1.3.3 Ouriços**

Recentemente, o foco científico voltou-se para os ouriços da castanha, um resíduo agroindustrial capaz de demonstrar valor comercial.

Moure *et al.* analisaram ouriços de castanha e verificaram um elevado potencial antioxidante, semelhante ao de antioxidantes sintéticos encontrados no mercado (89).

Apresentam-se ainda como uma fonte rica em fibra, com potenciais aplicações na indústria alimentar e no desenvolvimento de nutracêuticos (89).

## **2. Material e Métodos**

## 2.1 Reagentes

Ao longo deste trabalho foram utilizadas diferentes técnicas e reagentes. Os reagentes: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), Trolox, reagente de Folin Ciocalteu, ácido gálico, catequina,  $\alpha$ -amilase, eter de petróleo, ácido clorídrico, carbonato de sódio e hidroxitolueno butilado (BHT), foram adquiridos à Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha. O acetato de sódio; carbonato de sódio, nitrito de sódio 5%, cloreto de alumínio 10%; hidróxido de sódio 1M, sulfato ferroso 2 mM, tampão acetato 3M, solução tripiridiltriazina (TPTZ) 10 mM, cloreto férrico 20 mM, *n* – hexano foram adquiridos à Merck, Darmstadt, Alemanha. Por sua vez, o etanol e a norleucina pertencem à Fluka de Espanha, o ácido sulfúrico pertence à Carlo Erbo de Itália e o hidróxido de sódio é da PANREAC, Barcelona, Espanha. A água ultrapura é adquirida à TGI Pure Water Systems, EUA. Para a determinação da vitamina E foi utilizado o tocoferol e tocotrienol da Calbiochem (La Jolla, California, EUA) e o tocol: 2-metil-2- (4,8,12-trimetil tridecil)-cromano-6-ol adquirido à Matreya Inc. (Pennsylvania, EUA).

## 2.2 Recolha e Tratamento das Amostras

As amostras de castanha e ouriços foram recolhidas em três regiões distintas de Portugal (Minho, Beira Alta e Trás-os-Montes), durante o mês de Setembro de 2013. Foram conservadas a - 20°C e protegidas da luz, até serem analisadas.

Primeiramente, os ouriços foram separados das castanhas.

As castanhas, com casca, foram assadas num forno (TECNOGÁS, Portugal) a 240°C durante 35 minutos. Após este tempo as cascas foram retiradas da castanha. Este processamento foi necessário para se obter a amostra pretendida, as cascas de castanha.

Seguidamente, ambas as amostras (cascas e ouriço) foram trituradas num moinho (Grindomix Retsch, Düsseldorf, Alemanha) até se obter um pó fino, sendo posteriormente armazenadas em tubos de plástico a 5°C até posterior utilização.



### 2.3 Preparação dos Extratos (cascas e ouriços)

As amostras de casca e ouriço (2,5 g) foram submetidas à extração por solvente, por maceração (20 mL de solvente). Usaram-se 3 solventes (etanol, etanol: água (1:1) e água destilada) e a extração decorreu durante 30 minutos a 50°C.

Os extratos foram filtrados com papel de filtro Whatman No.1, concentrados sob vácuo a 37°C (Stuart, SBHCONC/1, Biocote) ou liofilizados (Telstar, Cryodos, Espanha), e conservados sob refrigeração a 4°C.

### 2.4 Determinação do Teor Total de Compostos Fenólicos

O teor fenólico total (CFT) foi determinado por espectrofotometria de acordo com o procedimento de Folin Ciocalteu (90), com pequenas modificações (91). Deste modo, 500 µL de extrato foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 10x) e deixou-se reagir durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 7,5% e deixado a repousar durante 15 minutos a 45°C, seguido de 30 minutos à temperatura ambiente, antes de ser determinada a absorvância a 765 nm, utilizando um Leitor de Microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). A correlação entre a absorvância da amostra e a concentração do padrão (ácido gálico) foi obtida através da curva de calibração (gama de linearidade: 5 - 100 µg / mL, R<sup>2</sup> > 0,9998). O teor de polifenóis totais dos extratos foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato liofilizado.

### 2.5 Determinação do Teor de Flavonoides

O teor total de flavonoides total foi determinado através da realização de um ensaio colorimétrico baseado na formação de complexos flavonoide-alumínio (92). Em resumo, 1 mL do extrato foi misturado com 4 mL de água ultrapura e 300 µL de solução de NaNO<sub>2</sub> 5% (peso/volume). Passados 5 minutos, 300 µL de uma solução AlCl<sub>3</sub> 10% (peso/volume) g/100 mL foi adicionada, e após 1 minuto, 2 mL de uma solução de NaOH 1mol/L e 2,4 mL de água ultrapura foram também adicionados. As absorvâncias foram lidas a 510 nm usando o leitor de microplacas Synergy HT Reader. A catequina foi utilizada como padrão para traçar a curva padrão (gama de linearidade: 0-400 µg / mL,

$R^2 > 0,999$ ). A concentração total de flavonoides total foi expressa como miligramas de equivalentes de catequina (CAE) por grama extrato liofilizado.

## **2.6 Atividade Antioxidante**

Os compostos pró-oxidantes estão implicados no desenvolvimento de doenças, entre elas, as doenças cardiovasculares, as inflamações crónicas e as doenças neurodegenerativas, como a doenças de Alzheimer e o Parkinson (93-95).

Os compostos antioxidantes, como os polifenóis, desenvolvem um importante papel no controlo do processo oxidativo do organismo, neutralizando as espécies reativas. A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos das amostras utilizou várias metodologias (DPPH e FRAP).

### **2.6.1. Determinação da Capacidade Antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>). A mistura da reação ocorreu numa placa de 96 poços, e foi constituída por diferentes concentrações da amostra (30 µL) e uma solução de metanol (270 µl) contendo radicais de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol / L). A mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos no escuro. A redução do radical DPPH<sup>•</sup> foi avaliada através da medição da absorvência a 517 nm (96). Foi preparada uma curva de calibração com o padrão Trolox (gama de linearidade: 5 - 100 µg / ml,  $R^2 > 0,9995$ ).

A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada como uma percentagem de descoloração do DPPH, passando de violeta a amarelo.

A concentração de extrato que conduz a 50% de atividade captadora de radicais (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir de um gráfico que relaciona a percentagem de ACR e a concentração do extrato, por interpolação gráfica. O butilhidroxianisol (BHA) foi utilizado como padrão.

### **2.6.2. Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro**

O método baseia-se na redução do complexo Fe (III) /ferricianeto [FeCl<sub>3</sub>/KFe (CN)<sub>6</sub>] a Fe (II), forma ferrosa, pela presença de um composto antioxidante na solução. O

poder antioxidante por redução do ião férrico foi determinado segundo metodologia previamente descrita (97).

Num tubo de ensaio, colocaram-se 90  $\mu$ L de extrato, 270  $\mu$ L de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (750 mL de tampão acetato 0,3 M, 75 mL solução TPTZ 10 mM e 75mL FeCl<sub>3</sub> 20 mM). Homogeneizou-se a solução e colocou-se em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos, as absorvâncias foram lidas a 592 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). O padrão sulfato ferroso 2mM foi usado para se obter a curva de calibração (gama de linearidade: 150 - 2000 M,  $R^2 > 0,996$ ).

## **2.7 Análise Química**

A análise química foi efetuada tendo por objetivo caracterizar o perfil nutricional das amostras de casca e ouriço, visando uma possível aplicação na indústria alimentar. Foram realizados diferentes ensaios para esta caracterização.

### **2.7.1 Determinação do Teor de Humidade**

O teor de humidade foi determinado com uma balança de determinação da humidade (Scaltec modelo SMO01, Scaltec Instruments, Germany). Cerca de 1 g de casca e 2 g de ouriço foram sujeitos a um processo de secagem a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  até atingirem um peso constante. A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados expressos em g / 100 g de amostra.

### **2.7.2 Determinação do Teor de Cinzas**

O teor de cinzas das amostras foi obtido por incineração de cerca de 1g de amostra a  $450 - 500^\circ\text{C}$  usando uma mufla (Thermolyne 48000, F48010-26, Electrothermal Engeneering Ltd, Essex, United Kingdom) até a obtenção de cinzas brancas. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de massa antes e depois do processo de incineração (98). A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados expressos em g / 100 de grama de amostra.

### **2.7.3 Determinação do Teor de Proteína**

O teor de proteína das amostras foi determinado através do método de Kjeldahl, quantificando o azoto total presente nas amostras (99). Cerca de 1g de amostra foi pesado em papel isento de azoto e colocado no tubo de Kjeldahl juntamente com duas pastilhas catalisadoras e 20ml de ácido sulfúrico a 96%. A digestão ácida foi efetuada numa manta elétrica, estando os tubos ligados a um sistema de vácuo para aspiração dos vapores. O resultado da digestão foi destilado (BUCHI KjelFlex K-360, Flawil, Switzerland) e titulado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M) para quantificação do azoto presente na amostra. A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados expressos em g / 100 de grama de amostra. O fator de conversão do azoto total para proteína utilizado foi de 6,25.

### **2.7.4 Determinação do Teor de Gordura Total**

A análise do teor de gordura foi efetuada pelo método de Soxhlet (100). Cerca de 5 g de amostra foi misturada com sulfato de sódio anidro. A mistura foi transferida para cartuchos de celulose e colocada em ampolas de extração dos dispositivos de Soxhlet. Foi feita uma extração com éter de petróleo para balões previamente tarados. Efetuou-se a eliminação do solvente por evaporação e a secagem do resíduo em estufa a 100°C, por períodos de 30 minutos até obtenção de peso constante. A análise foi efetuada em quadruplicado para cada amostra e os resultados expressos em g / 100 de grama de amostra.

### **2.7.5 Determinação do Teor de Fibra Dietética**

A análise da fibra dietética foi efetuada por um método enzimático-gravimétrico (101). Quatro alíquotas com cerca de 1g de amostras de casca e ouriço, foram digeridas e sujeitas a um processo de filtração (ensaios efetuados em duplicado). A amostra foi gelatinizada com uma incubação com  $\alpha$ -amilase termoestável, ao qual se seguiram duas incubações com protease e com aminoglucosidase, num banho termostaticado (Velp Scientific, Italia). A fibra foi precipitada com etanol e o resíduo filtrado e lavado com etanol e acetona. O teor de proteínas não digeridas foi determinado num dos duplicados de

cada alíquota (Método Kjeldahl), enquanto no outro duplicado, foi determinado o teor de cinzas (incineração a 525°C).

O teor de fibra da amostra é determinado retirando o teor de proteínas e de cinzas obtido da amostra, assim como o valor de branco (controlo).

### **2.7.6 Determinação do Perfil de Hidratos de Carbono**

O teor de hidratos de carbono é calculado indiretamente, por diferença dos restantes parâmetros do perfil nutricional das amostras. Foi usada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100\% - (\% \text{ Proteínas} + \% \text{ Gordura} + \% \text{ Humidade} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ fibra})$$

## **2.8 Determinação do Teor de Vitamina E**

A determinação do teor de vitamina E fez-se a partir da gordura extraída pelo método de Soxhlet. Para a identificação dos compostos individuais prepararam-se soluções padrão em n-hexano (28; 21; 14; 7; 3; e 1,5 mg/ml) contendo os seguintes vitâmeros:  $\alpha, \beta, \gamma$ ,  $\delta$ -tocoferol e  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tocotrienol. Cada uma destas soluções continha 20  $\mu\text{L}$  de padrão interno (PI, tocol) 1 mg/ml.

### **2.8.1 Preparação das Amostras**

A preparação das amostras para análise consistiu na pesagem rigorosa de 2 gotas de gordura para eppendorf, às quais se adicionaram 20  $\mu\text{L}$  de PI, perfazendo-se o volume a 1 ml com n-hexano. Agitou-se a mistura em vortex (VWR International) e centrifugou-se (Heraeus Sepatech Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Alemanha) a 13 000 rpm, durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos Supelco âmbar de 2 ml, para injetor automático, com rolhas perfuráveis, e conservados a -20 °C até posterior análise através de cromatografia líquida de alta performance com detecção por fluorescência (HPLC-DAD-FLD) (102).

## 2.8.2 Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC da Jasco (Japão) equipado com um injetor automático (AS-950), uma bomba (PU-980) e um detetor de fotodíodos (MD-910) acoplado a um detetor de fluorescência, FID (FP-920). A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna de fase normal Supelcosil LC-SI (3  $\mu\text{m}$ ; 75 mm  $\times$  3,0 mm; Supelco, Bellefonte, EUA), à temperatura ambiente (21 °C). Utilizou-se como eluente uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2), a um fluxo de 0,7 ml/minuto (102).

Os compostos foram identificados com base nos seus espetros e tempos de retenção, comparativamente aos dos padrões. A sua quantificação foi efetuada pelo método do padrão interno, usando os cromatogramas obtidos com o detetor de fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 290 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emissão}} = 330 \text{ nm}$ ). Os dados foram analisados no Software ChromNAV (Jasco, Japan). Todas as análises foram efetuadas em duplicado e os resultados expressos em mg/100 g de gordura.

## 2.9 Determinação do Perfil de Aminoácidos

### 2.9.1 Hidrólise

A hidrólise ácida utilizada para a determinação dos aminoácidos foi realizada de acordo com a literatura (103). Resumidamente, 0,250 g de amostra foram pesados para um tubo de vidro com tampa de rosca aos quais se adicionaram 3 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>. O oxigénio foi removido, utilizando uma corrente de azoto (N<sub>2</sub>).

Os tubos foram bem fechados e aquecidos a 110°C durante 24 horas. Os extratos foram neutralizados com KOH 12 mol.L<sup>-1</sup> a pH 7. O procedimento foi realizado em duplicado.

### 2.9.2 Derivatização

Os extratos obtidos das hidrólises foram centrifugados (Heraeus Sepatech Labofuge Ae, Heraeus Instruments, Germany) a 5000 rpm, durante 5 minutos. Retiraram-se 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um tubo de vidro, aos quais se adicionaram

500 µL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 200 µL de cloreto de dansilo e 1 mL de acetona (pH 9,5 - 10,5). Os frascos foram colocados na estufa onde permaneceram a 110 °C, durante 10 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, no escuro, retirou-se 1 mL do extrato derivatizado para eppendorf e centrifugou-se (Heraeus Sepatech Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Germany) a 13 000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos Supelco® âmbar, para injetor automático, com rolhas perfuráveis, e conservado a -20 °C até ser analisado por HPLC/FLD.

### **2.9.3 Análise Cromatográfica**

A análise cromatográfica foi realizada num sistema integrado de HPLC equipado com um injetor automático AS-950, uma bomba PU-98 e um detetor de fluorescência FP-920 (Jasco, Japão) ( $\lambda$  excitação: 335 nm e  $\lambda$  emissão: 514 nm). A separação cromatográfica ocorreu numa coluna de fase reversa Luna (5 mm, 150 x 4 mm) da Phenomenex (Torrance, USA), a uma temperatura controlada de 40 °C (Jasco CO-2060 Plus, Jasco, Japão). O sistema de gradiente de eluição consistiu em A) acetonitrilo, B) de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,0185 mol L<sup>-1</sup> com 4% de DMF e 0,1% de trietilamina (pH final  $\approx$  2,5): 0' 17% de A; 26' 50% de A, 28' 50% de A, 40' 90% de A. O volume de injeção foi 20 µL e o fluxo 1,1 mL/min.

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o software ChromNAV (Jasco, Japan). Os aminoácidos foram identificados por comparação do tempo de retenção com os padrões. A quantificação foi efetuada com base no método de padrão interno (com base na regressão da relação entre a resposta do analito e a resposta do padrão interno), utilizando sinais de fluorescência.

Preparou-se uma solução padrão de 500 mg/mL, contendo todos os aminoácidos em estudo. Usaram-se diferentes diluições para a obtenção das curvas de calibração (0,5 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,005 mg/mL).

## **2.10 Determinação da Atividade Antimicrobiana**

### **2.10.1 Estirpes de Microrganismos**

No estudo da atividade antimicrobiana foram incluídos oito microrganismos (sete bactérias e um fungo), representados quer por estirpes da Coleção de Cultura Americana

(American Type Culture Collection, ATCC) quer por isolados clínicos. As espécies selecionadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e isolado clínico), *S. epidermidis* (isolado clínico), *Escherichia coli* (ATCC 1576 e isolado clínico), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os isolados clínicos foram identificados recorrendo ao kit Vitek-2 (Biomérieux, France). Todas as espécies foram congeladas numa infusão de Brain Heart (Difco Laboratories, USA) com 20% de glicerol (Sigma) a - 70°C até análise. Em cada ensaio antimicrobiano foi previamente verificada a viabilidade celular recorrendo à cultura dos microrganismos em Nutrient agar (Difco Laboratories, USA), no caso das bactérias, e Sabouraud dextrose agar (SDA; Difco Laboratories, USA), no caso *C. albicans*.

### **2.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por ensaio de diluição**

A concentração inibidora mínima é definida como a concentração mais baixa de extrato capaz de inibir completamente o crescimento de microrganismos. A atividade antibacteriana e antifúngica foram, respetivamente, avaliadas de acordo com o micrométodo CLSI M7-A6 e com o micrométodo CLSI M27-A3, do mesmo protocolo, após 48 horas de incubação a 37°C (104-105). Resumidamente, foram preparadas diluições dos extratos em meio de Mueller Hinton (MH;Difco Laboratories, USA) para as bactérias e em RPMI (Biochrom,Germany) no caso dos fungos. As concentrações avaliadas variaram entre 0,1 µg/mL e 1 mg/mL. O crescimento microbiano foi visualmente comparado para cada concentração com o controlo (sem extrato). Todas as determinações foram realizadas em duplicado para cada ensaio, sendo realizados um total de três experiências independentes com resultados concordantes para cada extrato.

## **2.11 Análise Estatística**

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada recorrendo ao *software* estatístico SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para verificar as diferenças entre extratos foi realizado um teste ANOVA. As comparações post hoc das médias foram realizadas de acordo com o



teste HSD de Tukey. A significância foi definida para  $p < 0,05$  e foi estudada a correlação entre os diferentes ensaios.

## **3. Resultados e Discussão**

### 3.1. Escolha do Solvente

A escolha do solvente foi baseada nos valores obtidos após a realização do ensaio para a determinação dos compostos fenólicos totais. Foram utilizados 3 tipos de extratos (alcoólico, aquoso e hidroalcoólico) e testadas duas amostras (casca Minho e ouriço Minho). A Figura 6 apresenta as diferenças de cor observadas com a utilização dos três solventes em amostras de subprodutos de castanha.



Figura 6 – Aspeto macroscópico dos diferentes extratos, respetivamente, hidroalcoólico, alcoólico e aquoso, da esquerda para a direita.

Os valores obtidos para o CTF estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Conteúdo fenólico total (mg eq. Ácido Gálgico /g extrato seco) em cascas e ouriços do Minho. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Subproduto	Solvente	CTF (mg eq. Ácido gálgico / g extrato seco)
Casca	Água	16,44 $\pm$ 0,828 <sup>a</sup>
	Etanol: Água	241,9 $\pm$ 0,261 <sup>b</sup>
	Etanol	19,39 $\pm$ 1,153 <sup>a</sup>
Ouriço	Água	77,42 $\pm$ 4,787 <sup>c</sup>
	Etanol: Água	85,28 $\pm$ 0,702 <sup>c</sup>
	Etanol	17,61 $\pm$ 1,168 <sup>a</sup>

De acordo com os resultados obtidos pode concluir-se que o solvente que permite obter o teor de compostos fenólicos mais elevado é a mistura etanol e água (241,9 mg eq. Ácido Gálico / g extrato seco). A Tabela 2 apresenta os valores de rendimento de extração, com o solvente hidroalcoólico, expressos em %.

Tabela 2 - Rendimento de extração obtido para as diferentes amostras. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=2).

Subproduto	Zona	Rendimento (%)
Casca	Minho	13,7 $\pm$ 0,10
	Trás-os-Montes	12,5 $\pm$ 0,11
	Beira-Alta	4,10 $\pm$ 0,10
Ouriço	Minho	11,5 $\pm$ 0,20
	Trás-os-Montes	43,3 $\pm$ 0,15
	Beira-Alta	4,70 $\pm$ 0,10

A extração de polifenóis depende da dissolução de cada composto na matriz da planta e da sua difusão para o solvente externo, sendo a sua solubilidade influenciada pela natureza química da amostra da planta e pela polaridade dos solventes utilizados (106).

Vários outros solventes têm sido utilizados para a extração de compostos fenólicos de amostras de casca e ouriço, entre eles a acetona e o metanol (32, 47). No entanto, estes solventes não são considerados seguros para a utilização na alimentação. Por sua vez, o etanol tem a vantagem de ser considerado um bom solvente para a extração de compostos fenólicos e seguro para o consumo na alimentação (107). O etanol é reconhecido como um composto GRAS (generally recognized as safe), pelo que os extratos obtidos poderão ser utilizados para vários fins, sem colocar em risco a saúde humana. A sua fácil recuperação e reutilização torna-o uma boa opção para um processo que se quer eficaz e sustentável.

Pelos motivos apresentados foi selecionado para prosseguir os estudos o solvente hidroalcoólico.

### 3.2 Determinação do Teor Total de Fenólicos

A realização deste ensaio colorimétrico teve como objetivo a quantificação dos compostos fenólicos totais existentes nas amostras. Os fenóis contidos nas amostras são oxidados e a coloração passa de cor amarela a verde, a qual absorve a 750nm. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo fenólico total (mg eq. Ácido Gálico /g extrato seco) em casca e ouriços entre as diferentes zonas de estudo. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas (p <0,05).

Subproduto	Zona	CTF (mg eq. Ácido gálico /g extrato seco)
Casca	Minho	241,9 $\pm$ 0,261 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	796,8 $\pm$ 1,070 <sup>b</sup>
	Beira-Alta	143,0 $\pm$ 0,569 <sup>c</sup>
Ouriços	Minho	85,28 $\pm$ 0,702 <sup>d</sup>
	Trás-os-Montes	56,20 $\pm$ 3,425 <sup>e</sup>
	Beira-Alta	92,24 $\pm$ 1,194 <sup>f</sup>

De acordo com os resultados obtidos, os extratos que demonstraram possuir uma maior quantidade de compostos fenólicos foram a casca de Trás-os-Montes (796,8 mg EAG / g extrato seco) e a casca do Minho (241,9 mg EAG / g extrato seco), para concentrações de 0,1 mg/ml de extrato.

Entre os ouriços, o que apresenta maiores valores de CFT é o ouriço da Beira Alta (92,24 mg EAG / g extrato seco), sendo o de Trás-os-Montes o que apresenta um teor inferior de CFT (56,20mg EAG / g extrato seco).

A comparação entre subprodutos permite ainda verificar que, no que toca ao CFT, as cascas possuem valores muito superiores aos dos ouriços. Estes resultados estão em concordância com os valores obtidos por Vasquez *et al.* e Barreira *et al.* para as cascas da castanha, onde são determinados valores de CFT na ordem dos 400 a 500 mg EAG/g de extrato seco (31, 46).

### 3.3 Determinação do Teor de Flavonoides

Os flavonoides são polifenóis que abundam na nossa dieta e nos subprodutos da castanha (32, 43, 108).

O teor de flavonoides dos extratos foi determinado usando a catequina como padrão. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 4 - Teor de flavonóides totais (mg eq. Catequina /g extrato seco) em casca e ouriços das diferentes zonas de estudo. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas (p <0,05).

Subproduto	Zona	Flavonóides (mg eq. Catequina /g extrato seco)
Casca	Minho	31,38 $\pm$ 2,88 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	43,33 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>
	Beira-Alta	37,95 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>
Ouriços	Minho	33,67 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	4,91 $\pm$ 0,80 <sup>d</sup>
	Beira-Alta	26,24 $\pm$ 2,58 <sup>e</sup>

Relativamente aos flavonoides presentes nos extratos, a casca revelou quantidades superiores, com valores a variar entre 43,33 e 31,38 mg CAT / g extrato seco, para a casca de Trás-os-Montes e Minho, respetivamente. Valores elevados já tinham sido determinados em outros ensaios (31). Os ouriços possuem menos flavonoides do que as cascas, apresentando valores entre 33,67 e 4,91 mg CAT / g extrato seco. Esta diferença pode estar relacionada com o facto de o ouriço estar localizado na parte externa, estando assim mais exposto a agressões climáticas, que podem alterar o seu perfil de compostos fenólicos e a sua capacidade antioxidante. A casca encontra-se mais protegida, e como foi verificado no ensaio de CTF, os seus valores foram bastante superiores aos dos ouriços.

### 3.4 Atividade Antioxidante

#### 3.4.1 Determinação da Capacidade Antioxidante

A percentagem da descoloração da solução de DPPH foi determinada usando a equação:

$\% \text{ RSA} = [(ADPPH - AS) / ADPPH] 100$ , onde AS é a absorvência da solução na presença de extrato numa determinada concentração e ADPPH é a absorvência da solução de DPPH.

A visualização da mudança de cor é evidente na placa de leitura (Figura 7).

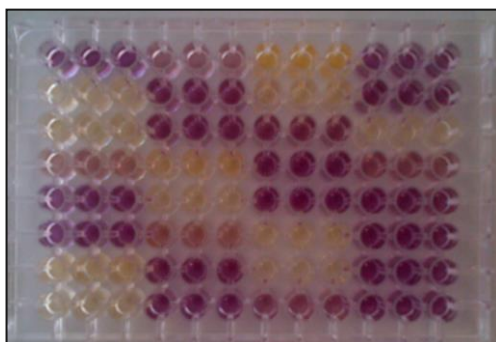


Figura 7 - Placa com 96 poços após a análise do DPPH, comprovando a diferença de cores após a reação.

Os valores obtidos para este ensaio estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de EC<sub>50</sub> (µg/mL) obtidos nos ensaios de atividade antioxidante para os diferentes subprodutos das zonas avaliadas. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas (p < 0,05).

Subproduto	Zona	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
Casca	Minho	37,61 ± 5,08 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	31,80 ± 1,13 <sup>a</sup>
	Beira-Alta	36,81 ± 4,55 <sup>a</sup>
Ouriços	Minho	38,67 ± 6,54 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	57,61 ± 9,29 <sup>b</sup>
	Beira-Alta	76,86 ± 4,4 <sup>c</sup>

Como é possível constatar, a casca de Trás-os-Montes apresentou um valor inferior de EC<sub>50</sub> (31,80 µg/ml), seguida da casca da Beira-Alta e da casca do Minho. Contudo, não existem diferenças significativas entre as amostras de casca. No que toca aos ouriços, os valores variam entre 38,67 e 76,86 µg/ml, para o ouriço do Minho e da Beira-Alta, respetivamente. Estes valores, mesmo sendo superiores aos obtidos para as cascas, podem considerar-se de elevado potencial antioxidante, demonstrando valores semelhantes aos referidos por Moure *et al.* (38 µg/ml) (109).

A análise estatística permite verificar a existência de diferenças consideráveis entre os dois tipos de amostra (casca e ouriço), tendo todas as cascas analisadas apresentando uma capacidade antioxidante superior à dos ouriços. Comparando as amostras, pode concluir-se que a casca de Trás-os-Montes e o ouriço do Minho são os subprodutos que demonstram possuir maior capacidade para a redução do radical de DPPH<sup>•</sup> e melhores valores de atividade antioxidante. Os valores de EC<sub>50</sub> para o ensaio de DPPH estão em concordância com os determinados por Barreira *et al.* onde também foi verificada uma maior atividade antioxidante para as cascas da castanha, quando analisados diferentes extratos (cascas, folhas, flores e frutos), obtendo valores de EC<sub>50</sub> de 39,7 µg/ml (31).

Os subprodutos de frutos secos, como a casca da amêndoa (193,56 µg/ml) e a casca da noz (0,35) mg/ml apresentam valores muito superiores quando comparados os valores das cascas e dos ouriços (46) (110).

Comparando os resultados obtidos com outro subproduto, como é o caso da casca da anona que apresenta um valor de EC<sub>50</sub> para o DPPH (0,97 mg/mL), tanto as amostras de casca como as de ouriço, revelam atividade antioxidante superior (111).

### **3.4.2 Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)**

A capacidade dos extratos de castanha para reduzir os iões de ferro foi determinada usando o ensaio de FRAP. Este ensaio mede a redução do ião férrico (Fe<sup>3+</sup>) ao ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) na presença de antioxidantes.

Os valores obtidos estão expressos na Tabela 6.



Tabela 6 - Atividade antioxidante dos diferentes extratos hidroalcoólicos de casca e ouriço baseado na sua capacidade de reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ao estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Subproduto	Zona	FRAP ( $\mu\text{mol/g}$ extrato seco)
Casca	Minho	6891,2 $\pm$ 355,00 <sup>a</sup>
	Trás-os-Montes	8083,5 $\pm$ 164,80 <sup>b</sup>
	Beira-Alta	6008,7 $\pm$ 138,60 <sup>c</sup>
Ouriços	Minho	4510,4 $\pm$ 146,90 <sup>d</sup>
	Trás-os-Montes	835,3 $\pm$ 55,02 <sup>e</sup>
	Beira-Alta	3878,9 $\pm$ 75,89 <sup>f</sup>

A casca de Trás-os-Montes apresenta valores de FRAP superiores a todas as outras amostras (6891  $\mu\text{mol} / \text{mg}$  extrato seco), sendo seguida pela casca da Beira-Alta. Os valores para os ouriços variaram entre 835 e 4510,4  $\mu\text{mol} / \text{mg}$  para o ouriço de Trás-os-Montes e do Minho, respetivamente.

### 3.5 Correlação de atividades

De modo a interligar os resultados obtidos efetuou-se uma correlação de atividades.

A Tabela 7 apresenta os valores da correlação de Pearson ( $R^2$ ) obtidos para os vários ensaios efetuados da atividade antioxidante, analisando todas as amostras de casca e de ouriço.

Tabela 7 – Valores de Correlação de Pearson ( $R^2$ ) obtidos para os ensaios.

Ensaio	EC50 DPPH	CTF	Flavonoides
CTF	-0,515	1	-
Flavonóides	-0,609	0,594	1
FRAP	-0,669	0,726	0,923

Pela análise da Tabela 7 verifica-se uma correlação negativa entre o EC<sub>50</sub> do DPPH e todos os outros ensaios efetuados. Podemos então inferir, que quando maior for a quantidade de compostos fenólicos (entre eles os flavonoides), nas amostras de casca e de ouriço, menor será a quantidade de extrato necessária, para se verificar atividade antioxidante. Para os ensaios de CFT e EC<sub>50</sub> do DPPH verificou-se uma correlação negativa ( $R^2 = -0,515$ ). Os resultados apresentados são semelhantes aos obtidos por autores que analisaram amostras semelhantes (46, 109, 112).

Barreira *et al.* estabelecem uma relação direta entre o potencial antioxidante de uma amostra e o seu teor em compostos fenólicos (31).

Todos os outros ensaios verificaram correlações muito positivas entre si, sendo assim verificada uma elevada capacidade antioxidante para todas as amostras. Entre a casca e o ouriço da mesma região existe uma correlação muito positiva. Entre a casca e o ouriço do Minho ( $R^2 = 0,998$ ), entre a casca e o ouriço da Beira-Alta ( $R^2 = 0,999$ ) e entre a casca e o ouriço de Trás-os-Montes ( $R^2 = 0,651$ ), o que leva a concluir a possível existência de uma semelhança de evolução entre as amostras, que pode estar relacionada com o tipo de solo e de clima onde estas se encontram.

Foram no entanto, os extratos de casca de castanha a apresentar sempre um potencial antioxidante superior.

Na Tabela 8 compara-se o potencial antioxidante de vários extratos de subprodutos através da análise do teor em compostos fenólicos.

Tabela 8 - Valores de CTF obtidos para diferentes subprodutos.

Subprodutos	Valores de CTF	Referência
Folha de Castanheiro	413 mg EAG/g	(46)
Casca de Amêndoa	592 mg EAG/g	(46)
Pele de Prata	302,5 mg EAG/L	(113)
Folha de <i>Medicago spp.</i>	36,41 mg EAG/g	(114)
Pericarpo da noz	74,8 mg EAG/g	(110)
Pele de Romã	276 mg EAG/g	(115)
		(116)

---

Semente de Uva	373,0 mg EAG/g	
Resíduos de sumo de Maçã	48,6 mg EAG/g	(117)
Resíduos de sumo de Pêra	60,7 mg EAG/g	(117)
Resíduos de sumo de Tomate	61,0 mg EAG/g	(117)
Resíduos de Alcachofra	514,2 mg EAG /g	(117)

---

Os valores obtidos para as amostras estão perfeitamente enquadrados, quando comparados com os valores apresentados por outros subprodutos (considerados de elevado potencial antioxidante), sendo o valor obtido para a casca de Trás-os-Montes (796,8 mg EAG / g extrato seco) bastante superior a todos eles. As diferenças de valores poderão relacionar-se com o facto de as matrizes serem diferentes, mas também com os diferentes tipos de tratamento e de solventes a que as amostras foram sujeitas.

Os extratos de folha de castanha e de sementes de uva foram já investigados como potenciais antioxidantes naturais para a preservação da qualidade de enchidos (116). Lorenzo *et al.* verificaram que estes extratos são mais eficazes do que o BHT, um antioxidante e conservante sintético, usado em várias indústrias, entre elas a alimentar e a cosmética (116).

Uma potencial aplicação na indústria cosmética foi estudada, para os extratos de folhas de casca de castanha, de folhas de *Medicago spp.* e de ouriço de castanha, tendo-se verificado um elevado potencial antioxidante e ausência de toxicidade, ideal para a aplicação em formulações cosméticas (71, 114, 118).

A partir da análise dos valores de CTF obtidos para os vários subprodutos, e as aplicações para as quais foram testados em ensaios prévios, podemos almejar idênticas aplicações para os extratos analisados. Se pensarmos que no processamento de 1 Kg de castanhas cerca de 20% corresponde a resíduos de casca, numa produção anual de 500 toneladas, isto implica uma produção de cerca de 100 toneladas de resíduos de casca. Através deste valor podemos prever um elevado impacto em termos ambientais, o reaproveitamento de uma elevada quantidade de compostos bioativos e o lucro que pode ser gerado se estes subprodutos forem valorizados e utilizados por novas indústrias.

A partir da análise dos valores de CTF obtidos para os vários subprodutos, e as aplicações para as quais foram testados em ensaios prévios, podem-se almejar idênticas aplicações para os extratos analisados. Se se pensar que no processamento de 1 kg de

castanhas cerca de 20% corresponde a resíduos de casca, numa produção anual de 500 toneladas, isto implica uma produção de cerca de 100 toneladas de resíduos de casca. Através deste valor pode prever-se um elevado impacto em termos ambientais, o reaproveitamento de uma elevada quantidade de compostos bioativos e o lucro que pode ser gerado se estes subprodutos forem valorizados e utilizados por novas indústrias.

### 3.5.1 Comparação entre os vários constituintes da *Castanea sativa* Mill

Na Tabela 9 pode comparar-se o teor em compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos vários constituintes da castanha que é produzida na região de Trás-os-Montes. Foram analisados os valores obtidos neste trabalho para o caso da casca e do ouriço, e valores determinados por *Barreira et al.* para as restantes amostras (31). É verificado o elevado potencial da casca em relação aos restantes constituintes, sendo seguida pelo ouriço e pela flor. Pela análise dos resultados, o fruto é o que apresente menor capacidade antioxidantes e menor conteúdo em compostos fenólicos.

Uma vez que a folha da castanha já foi investigada para aplicação em formulações tópicas, estas amostras podem ser de elevado interesse para a indústria cosmética (71).

Tabela 9 – Comparação entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos vários constituintes da *C. sativa* Mill.

	Flor	Fruto	Folha	Casca	Ouriço
<b>EC 50 DPPH</b> (µg/mL)	74,9	nd	170	31,8	57,61
<b>CTF</b> (mg EAG/g)	298	3,73	103	796,8	56,2
<b>Flavonoides</b> (mg eq. Cat/g)	160	2,3	54,5	43,3	4,9

nd – não determinado

## 3.6 Análise Química

### 3.6.1 Caracterização do Perfil Nutricional

A caracterização nutricional de subprodutos é muito importante para o aumento do conhecimento sobre estes resíduos, de modo a avaliar a sua possível aplicação na indústria. Os valores nutricionais determinados para as amostras estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores nutricionais das amostras analisadas. Os valores (g/100g de amostra) são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Subproduto		Cinzas (g/100g)	Proteína (g/100g)	Gordura (g/100g)	Humidade (g/100g)
Casca	Minho	1,60 $\pm$ 0,06	3,13 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,00	38,6 $\pm$ 1,78 <sup>a</sup>
	Beira-Alta	1,36 $\pm$ 0,04	2,77 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	26,2 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>
	Trás-os-Montes	1,08 $\pm$ 0,04	2,89 $\pm$ 0,17	nd	21,3 $\pm$ 1,56 <sup>c</sup>
Ouriço	Minho	5,61 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	3,16 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,01	26,9 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>
	Beira-Alta	1,37 $\pm$ 0,05	2,22 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,85 $\pm$ 0,00	15,5 $\pm$ 0,36 <sup>d</sup>
	Trás-os- Montes	1,80 $\pm$ 0,06	3,14 $\pm$ 0,15	1,59 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	25,6 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>

nd não determinado

A análise nutricional revelou que tanto a casca como o ouriço são constituídos por uma elevada quantidade de água (15-40%) e por um teor proteico na ordem dos 3%. O teor de cinzas variou entre 1 e 5%, enquanto a gordura registou valores muito baixos, na ordem de 1%, tal como era expectável. O teor de humidade, por seu lado, oscilou entre 15 e 40g /100g de extrato, para o ouriço da Beira-Alta e a casca do Minho, respetivamente. A região do Minho está sujeita a um clima muito chuvoso, podendo ser este um dos fatores responsáveis pelos elevados valores de humidade das suas cascas e ouriços.

Todas as amostras revelaram um perfil nutricional semelhante, baixo teor em gordura e alto teor em fibra. Estes valores são similares aos obtidos para outros subprodutos, como a casca do abacaxi, onde se verificaram valores de proteínas na

ordem dos 4% e de gordura de cerca de 0,6% (119). Se compararmos os valores determinados para a casca da castanha com os da polpa da anona (valores de 1 a 2 g/100g para a proteína e valores inferiores a 1% para a gordura), mais uma vez, encontramos valores nutricionais muito próximos entre subprodutos (111).

O teor de hidratos de carbono obtido para a amostra de ouriço de Trás-os-Montes foi de 21,06g /100g de amostra, onde foi efetuada toda a caracterização nutricional.

Na Figura 8 podemos verificar as amostras após a avaliação do teor de humidade.



Figura 8 - Aspeto macroscópico das amostras após avaliação do teor de humidade.

### 3.6.2 Fibra Dietética

O teor de fibra foi analisado tendo em conta o aumento de procura de alimentos ricos em fibra por parte dos consumidores, devido aos efeitos positivos que advêm do seu consumo.

Uma vez que a avaliação dos parâmetros anteriores permite verificar que a amostra de Trás-os-Montes, quer na casca, quer no ouriço, apresenta sempre os resultados mais promissores, o teor de fibra foi avaliado para estas amostras. Os resultados obtidos foram de 47,27% para a casca e 46,81% para o ouriço.

O teor de fibra dietética determinado é assim muito semelhante para ambos os subprodutos. Um estudo desenvolvido por Moure *et al.* no ouriço da castanha conduziu a resultados semelhantes (109).

O valor determinado é bastante próximo do valor obtido para outros alimentos que se encontram no mercado e fazem parte da nossa dieta, como feijões e cereais (120).

Com efeito, face aos resultados obtidos, ambas as amostras podem ser consideradas uma boa fonte de fibra dietética, que poderia ser usada como potencial ingrediente para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos. De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), para que um produto possa ser designado como sendo uma "alta fonte de fibra", este deve conter, um valor não inferior a 20% de fibra na sua composição (119). Podemos então considerar que estes subprodutos poderão ter uma aplicação na indústria alimentar como nutracêuticos ou suplementos alimentares.

A crescente utilização de fibras de fontes naturais na produção de biocompósitos, como por exemplo, da casca do coco e do abacaxi, pode fazer prever outra aplicação para o reaproveitamento das fibras da casca e do ouriço, após a avaliação das suas propriedades físicas (121).

### **3.7 Vitamina E**

A vitamina E é composta por um conjunto de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis sintetizados pelas plantas. Além das propriedades antioxidantes que lhe estão atribuídas, a vitamina E pode ser usada para a identificação das variedades de castanha, de acordo com o seu perfil em tocoferol e tocotrienol (12). Com efeito, a presença de vitamina E nas cascas e nos ouriços de castanha aumenta a capacidade antioxidante das amostras e a sua potencial valorização. Na Tabela 11 estão sintetizados os valores de vitâmeros da vitamina E para as amostras em estudo.

Tabela 11 – Valor total de Vitamina E e dos diferentes vitâmeros das amostras de casca e ouriço das regiões estudadas. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=2). Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas (p < 0,05). Valores expressos em mg/100g de amostra.

Vitâmeros	Amostra					
	Casca (Zona)			Ouriços (Zona)		
	Minho	Trás-os-Montes	Beira-Alta	Minho	Trás-os-Montes	Beira-Alta
$\alpha$ -tocoferol	65,9 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	191 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	162 $\pm$ 0,87 <sup>c</sup>	137 $\pm$ 2,41 <sup>d</sup>	146 $\pm$ 3,81 <sup>e</sup>	196 $\pm$ 1,01 <sup>b</sup>
$\beta$ -tocoferol	12,0 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	14,2 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	6,75 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	3,36 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	6,39 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	6,17 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>
$\gamma$ -tocoferol	229 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	670 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	357 $\pm$ 1,74 <sup>c</sup>	15,5 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>	318 $\pm$ 7,14 <sup>c</sup>	39,5 $\pm$ 1,09 <sup>e</sup>
$\delta$ -tocoferol	29,9 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	69,3 $\pm$ 0,68 <sup>d</sup>	33,6 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>	50,4 $\pm$ 1,18 <sup>e</sup>	37,4 $\pm$ 1,18 <sup>c</sup>	37,3 $\pm$ 1,22 <sup>bc</sup>
$\alpha$ -tocotrienol	19,4 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	8,58 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	4,28 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	6,56 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>	8,12 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	9,69 $\pm$ 0,35 <sup>e</sup>
$\beta$ -tocotrienol	34,6 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	2,99 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	nd
$\gamma$ -tocotrienol	67,8 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	nd	nd	41,9 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	99,1 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	41,6 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>
$\delta$ -tocotrienol	23,4 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	9,57 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	4,33 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup>	3,77 $\pm$ 0,08 <sup>cd</sup>	6,18 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>	3,04 $\pm$ 0,97 <sup>d</sup>
<b>Total</b>	482,00	962,65	567,96	258,49	624,08	333,30

nd - não determinado

As amostras são compostas, principalmente, por  $\gamma$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocoferol. O  $\gamma$ -tocoferol é o vitâmero que também se encontra em maior quantidade na composição da castanha, sendo ainda considerado o mais abundante na natureza e o que possui maior atividade biológica (8).

Em termos globais são a casca e o ouriço de Trás-os-Montes as amostras que apresentam maior quantidade de vitamina E. O teor em  $\gamma$ -tocoferol apresentado para esta região pelas cascas (670 mg/100g) e ouriços (318 mg/100 g) em estudo é bastante elevado, sendo seguidos pelas amostras da Beira-Alta.

É de salientar o facto da casca do Minho ser constituída por  $\beta$ -tocotrienol e o  $\gamma$ -tocotrienol, vitâmeros que não são detetados nas cascas das outras regiões em estudo.

A casca do Minho e o ouriço de Trás-os-Montes têm em comum o  $\beta$ -tocotrienol no seu perfil. Estes elementos, em conjunto com a variabilidade genética de diferentes cultivares, podem ser fatores de diferenciação entre as amostras e entre as regiões produtores de castanha.

Os valores determinados de  $\gamma$ -tocoferol para os subprodutos, quando comparados com os valores obtidos para a castanha de Trás-os-Montes (0,4 – 0,5 mg/100 g fruto



fresco), são muito superiores, sendo este um motivo de elevada importância para o seu reaproveitamento (12).

Todas as amostras analisadas demonstraram um elevado teor de vitamina E, quando comparadas com outros produtos que fazem parte da dieta, como é o caso da carne (0,24 mg/100g), do leite (0,03 mg /100g) ou do café (2,09 µg /30ml) (122-123). Sendo as amostras subprodutos de um fruto seco, se estas forem comparadas em perfil de  $\alpha$ -tocoferol, com outros frutos como as avelãs (31.4 mg/100g) ou as amêndoas (24.2 mg/100g), um elevado potencial é verificado (124).

Comparando o perfil em Vitamina E das amostras com um subproduto resultante da produção do café, a pele de prata (1 a 2 mg/100g de amostra), os valores determinados são em termos globais muito superiores (125).

O valor recomendado para o aporte diário de vitamina E é de 15mg de  $\alpha$ -tocoferol, valor inferior ao determinado para as amostras de casca e de ouriço (122).

Além da sua utilização a nível alimentar, a vitamina E tem tido novas aplicações na indústria cosmética, sendo utilizada para a produção de nanoemulsões benéficas para a prevenção do envelhecimento da pele (126).

Os benefícios para a saúde atribuídos à utilização da vitamina E, faz com que as amostras de casca e ouriço da castanha vejam elevadas as suas possíveis aplicações.

### **3.8 Aminoácidos**

As proteínas são constituídas por vinte aminoácidos essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados pelo organismo e têm que ser fornecidos pela dieta a fim de garantir um bom desenvolvimento físico (127). A isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, arginina e histidina são aminoácidos considerados essenciais para o bom funcionamento do organismo.

Foi realizada uma análise cromatográfica para determinar o perfil de aminoácidos presente nas amostras de casca e de ouriço. A Figura 9 mostra o cromatograma obtido para a casca do Minho.

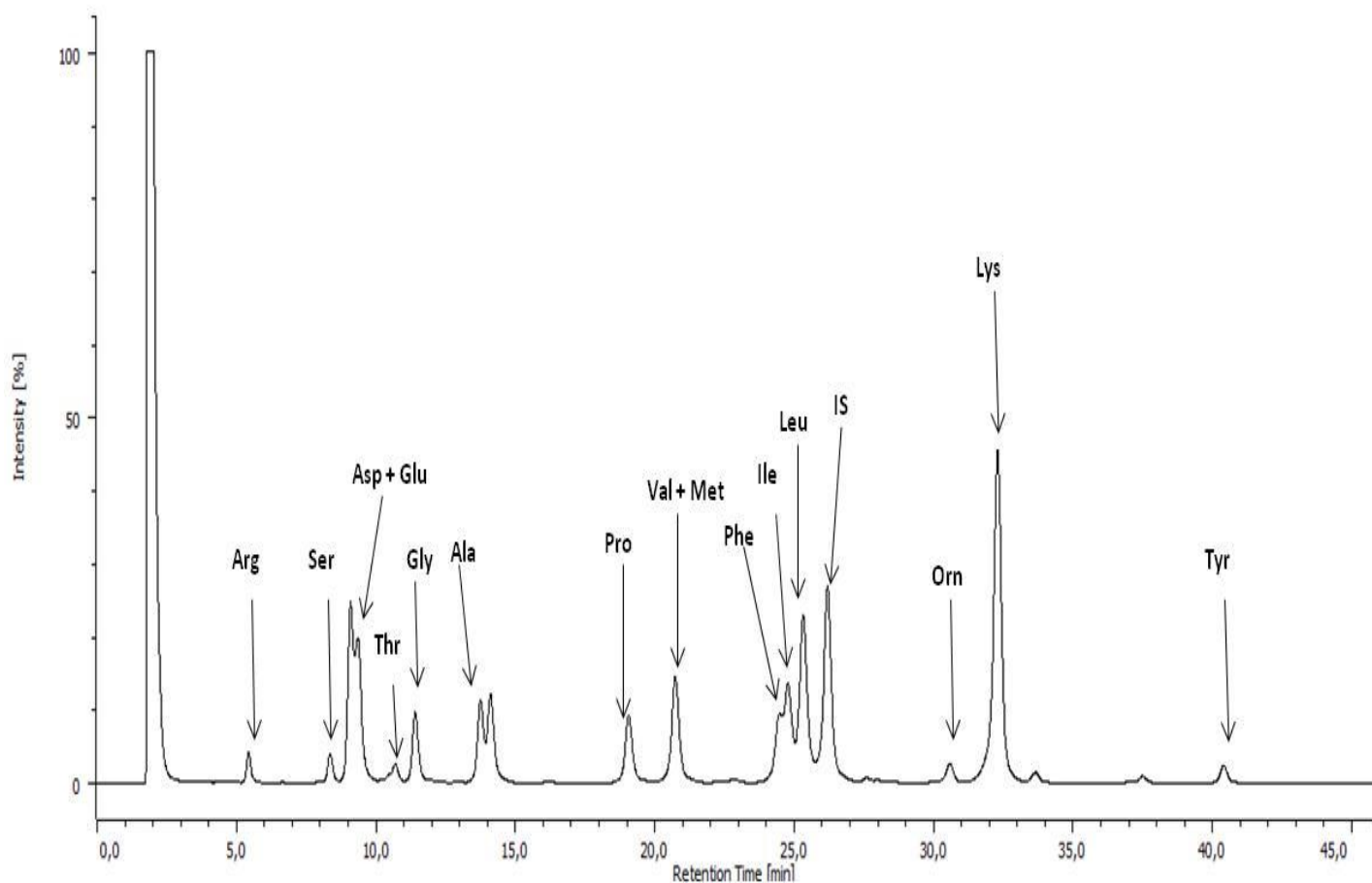


Figura 9 – Cromatograma referente aos aminoácidos analisados no extrato da casca do Minho.

O potencial das amostras como fonte de aminoácidos foi avaliado e os resultados apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Teor em aminoácidos (mg/g de extrato seco) dos diferentes extratos hidroalcoólicos. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=2).

Aminoácidos	Amostra						Referência (128)
	Cascas (Zona)			Ouriços (Zona)			
	Minho	Trás-os-Montes	Beira-Alta	Minho	Trás-os-Montes	Beira-Alta	
Aminoácidos Essenciais							
His	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.00
Ile	1,32±0,10 <sup>ac</sup>	1,43±0,04 <sup>c</sup>	0,99±0,10 <sup>b</sup>	1,34±0,04 <sup>ac</sup>	1,75±0,02 <sup>d</sup>	1,22±0,11 <sup>a</sup>	4.00
Leu	2,08±0,16 <sup>a</sup>	2,46±0,10 <sup>c</sup>	1,59±0,15 <sup>b</sup>	2,21±0,04 <sup>ac</sup>	2,90±0,16 <sup>d</sup>	2,05±0,06 <sup>a</sup>	7.00
Lys	1,32±0,11 <sup>a</sup>	1,56±0,04 <sup>b</sup>	1,09±0,01 <sup>c</sup>	1,14±0,031 <sup>c</sup>	1,66±0,06 <sup>b</sup>	1,01±0,04 <sup>c</sup>	5.50
Phe	0,79±0,07 <sup>ab</sup>	0,91±0,04 <sup>bc</sup>	0,63±0,06 <sup>ab</sup>	0,90±0,03 <sup>bc</sup>	1,11±0,06 <sup>c</sup>	0,60±0,21 <sup>a</sup>	4.29
Tyr	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0,14±0,07 <sup>ab</sup>	0,11±0,00 <sup>b</sup>	0,35±0,02 <sup>c</sup>	0,19±0,05 <sup>a</sup>	
Thr	1,01±0,05 <sup>a</sup>	1,25±0,09 <sup>b</sup>	0,74±0,06 <sup>c</sup>	1,36±0,05 <sup>bd</sup>	1,45±0,08 <sup>d</sup>	0,98±0,09 <sup>a</sup>	4.00
Arg	7,21±0,71 <sup>a</sup>	7,15±0,78 <sup>a</sup>	3,55±0,19 <sup>b</sup>	4,28±0,20 <sup>b</sup>	7,49±0,35 <sup>a</sup>	3,33±0,24 <sup>b</sup>	5.00
Val + Met	0,51±0,04 <sup>a</sup>	0,58±0,01 <sup>cd</sup>	0,38±0,04 <sup>b</sup>	0,55±0,01 <sup>ac</sup>	0,61±0,02 <sup>d</sup>	0,41±0,03 <sup>b</sup>	Val: 5.42 Met: 3.50
Aminoácidos Não Essenciais							
Ala	0,84±0,06 <sup>ae</sup>	0,95±0,04 <sup>ac</sup>	0,51±0,04 <sup>b</sup>	1,07±0,09 <sup>c</sup>	0,76±0,02 <sup>de</sup>	0,69±0,05 <sup>d</sup>	
Ser	1,21±0,12 <sup>a</sup>	1,60±0,13 <sup>b</sup>	1,06±0,04 <sup>a</sup>	1,30±0,12 <sup>a</sup>	1,61±0,07 <sup>b</sup>	1,18±0,15 <sup>a</sup>	
Asp + Glu	4,03±0,38 <sup>a</sup>	4,84±0,32 <sup>b</sup>	2,68±0,12 <sup>c</sup>	3,24±0,22 <sup>c</sup>	4,61±0,10 <sup>b</sup>	2,74±0,23 <sup>c</sup>	
Gly	0,71±0,04 <sup>a</sup>	0,79±0,04 <sup>ac</sup>	0,51±0,01 <sup>b</sup>	0,87±0,08 <sup>c</sup>	0,75±0,02 <sup>a</sup>	0,60±0,01 <sup>b</sup>	
Pro	1,82±0,15 <sup>a</sup>	2,41±0,09 <sup>c</sup>	1,85±0,22 <sup>a</sup>	1,94±0,05 <sup>ab</sup>	2,27±0,08 <sup>b</sup>	1,90±0,25 <sup>abc</sup>	
Orn	0,09±0,01 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>c</sup>	0,02±0,01 <sup>c</sup>	0,02±0,00 <sup>c</sup>	0,05±0,00 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>c</sup>	

nd não determinado

Numa avaliação global dos resultados, verifica-se que o teor de aminoácidos identificado é superior tanto na casca como no ouriço de Trás-os-Montes.

Através da análise da Tabela 10 pode concluir-se as amostras têm na sua constituição bastantes aminoácidos considerados essenciais. Os valores detetados são, no entanto inferiores, quando comparados com os valores de referência, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), com exceção da arginina.

A arginina e a leucina são os aminoácidos presentes em maior quantidade, apresentando valores na ordem dos 7 e 4 mg/g de amostra de extrato seco. A ornitina apresenta valores muito baixos (inferiores a 0,1 mg/g de amostra de extrato seco) para todas as amostras, enquanto a histidina não é detetada em nenhuma amostra analisada.

De acordo com o perfil de aminoácidos detetado nas amostras, podemos concluir que estas possuem aminoácidos em quantidade suficiente para apresentarem valor nutricional quando comparadas com outros subprodutos, como é o caso da silagem, usada principalmente, para a alimentação do gado (129).

Tem-se verificado um aumento da utilização de aminoácidos para a produção de suplementos alimentares e de produtos cosméticos. No mercado podem encontrar-se variados suplementos alimentares à base de aminoácidos, assim como cremes e champôs que apresentam na sua constituição arginina e outros aminoácidos.

A utilização de aminoácidos em suplementos alimentares por parte das pessoas mais idosas está associado a uma melhoria do seu estado nutricional e da sua qualidade de vida, uma vez que podem intervir no aumento da força muscular e ainda melhorar sintomas depressivos (130).

Existe, portanto, um mercado em expansão para a aplicação de aminoácidos, o que aumenta o interesse das amostras analisadas, sendo estas uma fonte de aminoácidos de baixo custo.

### **3.9 Atividade Antimicrobiana**

A concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos foi determinada usando os métodos modificados de CLSI contra os microrganismos selecionados, bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), bactérias Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) e leveduras (*C. albicans*). Os resultados não revelaram atividade inibitória contra qualquer um dos microrganismos testados. Isto pode ser atribuído ao facto dos microrganismos Gram-negativos serem constituídos por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (ausente nos microrganismos Gram-positivos), que pode, limitar a difusão de compostos hidrófobos para o interior da célula. Por outro lado,

bactérias Gram-positivas possuem bombas de efluxo que controlam a célula, conferindo-lhes um mecanismo de resistência que poderia justificar a ausência de atividade do extratos.

### 3.10 Análise das diferenças entre as regiões avaliadas

As diferenças entre as regiões produtoras de castanha (Minho, Beira-Alta e Trás-os-Montes) ficaram bem demonstradas neste estudo. As cascas e os ouriços das três regiões apresentam diferentes atividades antioxidantes e valores nutricionais, podendo estas estar associadas a diferenças na composição dos solos, condições climáticas e variabilidade genética.

Na Figura 10 podemos verificar as diferenças climáticas que afetam as diferentes regiões do país e a sua influência na desertificação dos solos.

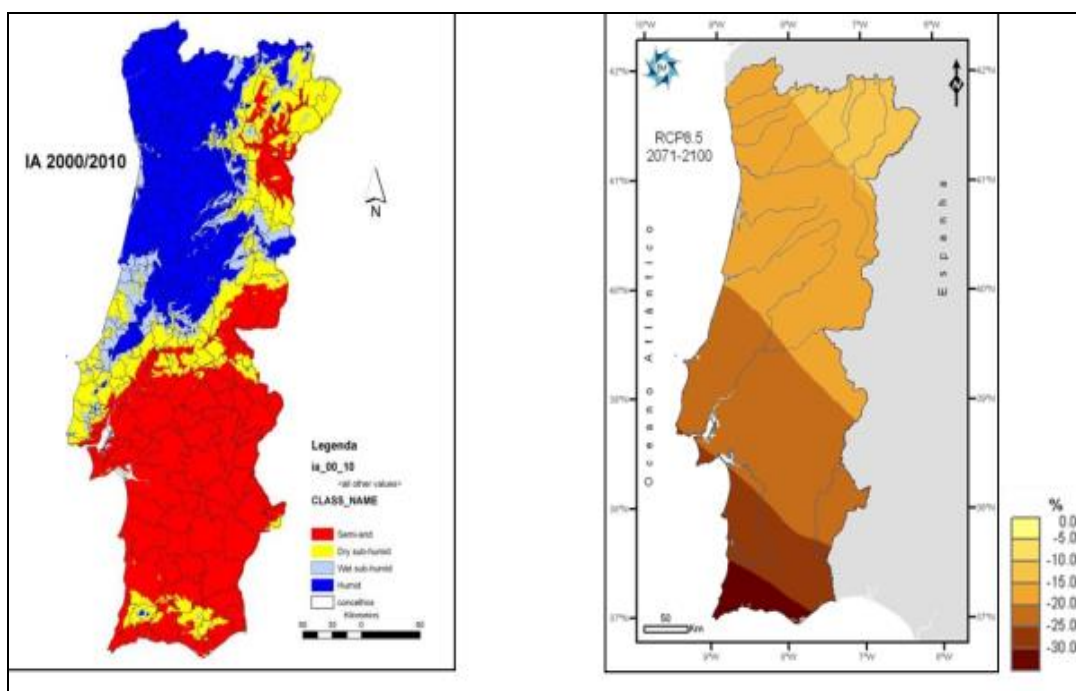


Figura 10 - Alterações climáticas e influências na desertificação dos solos (Fonte: Comissão Nacional de Coordenação de Combate à Desertificação (2012)).

É possível observar grandes diferenças climáticas entre as zonas em estudo. Consta-se uma elevada precipitação nas regiões do Minho e Beira-Alta em comparação com a região de Trás-os-Montes, que é mais seca e árida. Isto pode ter uma influência

direta sobre os solos e sobre a matéria orgânica que os compõem. Estes factores podem afetar a qualidade ambiental e ecológica dos solos, como a regulação hídrica e a sua biodiversidade. O aumento da temperatura associado a condições de maior secura poderá ter como efeito direto a diminuição da matéria orgânica, devido a uma menor produção de biomassa e mineralização.

Estas alterações poderão estar na origem da variância verificada entre as amostras das regiões estudadas. Os compostos orgânicos e o desenvolvimento de defesas no combate ao stresse oxidativo provocado por condições atmosféricas desfavoráveis podem potenciar diferenças na composição biológica entre as amostras das três regiões produtoras, e alterar a sua composição nutricional e potencial antioxidante.

Se avaliarmos os parâmetros estudados a todos os níveis, podemos concluir que as cascas e os ouriços da região de Trás-os-Montes, são as amostras que apresentam melhores características (131).

## **4. Conclusão**

O trabalho realizado pretendeu valorizar dois subprodutos resultantes do processamento da castanha (casca e ouriço), visando uma possível reutilização. Em análise estiveram também as três principais regiões produtoras de castanha em Portugal.

A avaliação global deste trabalho permitiu concluir que todas as amostras de subprodutos são constituídas por um elevado teor de compostos bioativos, principalmente, compostos fenólicos, que lhes conferem uma importante ação antioxidante contra os radicais livres, decorrentes do stresse oxidativo. São-lhe deste modo atribuídos benefícios para a saúde humana e animal.

A análise nutricional permitiu um maior conhecimento da constituição destes subprodutos, com ainda poucos estudos publicados. Os resultados foram bastante positivos, tendo as amostras demonstrado elevada quantidade em fibras, vitamina E e aminoácidos.

Apesar de todas as amostras terem demonstrado elevado potencial antioxidante e nutricional, entre todas em análise, foi a casca de Trás-os-Montes a que mais se destacou.

As cascas e os ouriços poderão estar na base de novos produtos desenvolvidos pela indústria alimentar ou cosmética devido à elevada qualidade das matrizes.

A sua valorização pode contribuir para a sustentabilidade de todo o processamento da castanha.



## **5. Referências Bibliográficas**

1. INE. Estatísticas Agrícolas 2012. In: Instituto Nacional de Estatística IP, editor. Lisbon, 2013.
2. de Vasconcelos MD, Bennett RN, Rosa EAS, Cardoso JVF. Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation. J Agric Food Chem. 2007; 55(9):3508-16.
3. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012.
4. Cruz BR, Abraão AS, Lemos AM, Nunes FM. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). Carbohydr Polym. 2013; 94(1):594-602.
5. de Vasconcelos MD, Bennett RN, Rosa EAS, Ferreira-Cardoso JV. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. J Sci Food Agric. 2010; 90(10):1578-89.
6. Nazzaro M, Barbarisi C, La Cara F, Volpe MG. Chemical and biochemical characterisation of an IGP ecotype chestnut subjected to different treatments. Food Chem. 2011; 128(4):930-6.
7. Gonçalves B, Borges O, Costa HS, Bennett R, Santos M, Silva AP. Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. Food Chem. 2010; 122(1):154-60.
8. Barreira JC, Casal S, Ferreira IC, Peres AM, Pereira JA, Oliveira MB. Chemical characterization of chestnut cultivars from three consecutive years: chemometrics and contribution for authentication. Food Chem Toxicol. 2012; 50(7):2311-7.
9. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. Am J Med. 2004; 116(4):263-72.
10. Livingstone K, Givens D, Cockcroft J, Pickering J, Lovegrove J. Is fatty acid intake a predictor of arterial stiffness and blood pressure in men? Evidence from the Caerphilly Prospective Study. Nutr Metab Cardiovas. 2013; 23(11):1079-85.
11. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. JAMA. 2002 26; 287(24):3223-9.
12. Barreira JCM, Alves RC, Casal S, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Vitamin E profile as a reliable authenticity discrimination factor between chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars. J Agric Food Chem. 2009; 57(12):5524-8.
13. Fernandes A, Barreira JC, Antonio AL, Bento A, Luisa Botelho M, Ferreira IC. Assessing the effects of gamma irradiation and storage time in energetic value and in major individual nutrients of chestnuts. Food Chem Toxicol. 2011; 49(9):2429-32.
14. Barreira JCM, Carocho M, Ferreira ICFR, Antonio AL, Kaluska I, Botelho ML, Bento A, Oliveira MBPP. Effects of gamma and electron beam irradiations on the triacylglycerol profile of fresh and stored *Castanea sativa* Miller samples. Postharvest Biol Technol. 2013; 81(0):1-6.
15. Vázquez G, González-Alvarez J, Santos J, Freire MS, Antorrena G. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. Ind Crop Prod. 2009; 29(2–3):364-70.
16. Demirkesen I, Mert B, Sumnu G, Sahin S. Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations. J Food Eng. 2010; 101(3):329-36.

17. Caroch M, Calhella RC, Queiroz M-JRP, Bento A, Morales P, Soković M, Ferreira ICFR. Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. *Ind Crop Prod*. 2014; 62(0):42-6.
18. Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K.. FAO Technical Meeting on Prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:156-9
19. Blaiotta G, La Gatta B, Di Capua M, Di Luccia A, Coppola R, Aponte M. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. *Food Microbiol*. 2013; 36(2):161-9.
20. Correia PR, Nunes MC, Beirão-da-Costa ML. The effect of starch isolation method on physical and functional properties of Portuguese nuts starches. I. Chestnuts (*Castanea sativa* Mill. var. Martainha and Longal) fruits. *Food Hydrocoll*. 2012; 27(1):256-63.
21. Alañón ME, Schumacher R, Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I, Pérez-Coello MS. Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics. *Food Res Int*. 2013; 51(2):536-43.
22. Alañón ME, Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. Aromatic potential of *Castanea sativa* Mill. compared to *Quercus* species to be used in cooperage. *Food Chem*. 2012; 130(4):875-81.
23. Sánchez-Martín J, Beltrán-Heredia J, Gragera-Carvajal J. *Caesalpinia spinosa* and *Castanea sativa* tannins: A new source of biopolymers with adsorbent capacity. Preliminary assessment on cationic dye removal. *Ind Crop Prod*. 2011; 34(1):1238-40.
24. Lélé SM. Sustainable development: A critical review. *World Development*. 1991; 19(6):607-21.
25. UNEP. Declaration of the United Nations Conference on the Human Environment. Stockholm, 1972.
26. UNEP. Millennium ecosystem assessment, synthesis report: ecosystems and human well-being: general synthesis. Island Press, Washington DC, 2005.
27. Behrens A, Giljum S, Kovanda J, Niza S. The material basis of the global economy: Worldwide patterns of natural resource extraction and their implications for sustainable resource use policies. *Ecol Econom*. 2007; 64(2):444-53.
28. Reisch L, Eberle U, Lorek S. Sustainable food consumption: an overview of contemporary issues and policies. *SSPP*. 2013;9(2):7-25.
29. Nagalingam SV, Kuik SS, Amer Y. Performance measurement of product returns with recovery for sustainable manufacturing. *Robot Cim-Int Manuf*. 2013; 29(6):473-83.
30. Del Borghi A, Gallo M, Strazza C, Del Borghi M. An evaluation of environmental sustainability in the food industry through Life Cycle Assessment: the case study of tomato products supply chain. *J Clean Prod*. 2014; 78(0):121-30.
31. Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem*. 2008; 107(3):1106-13.
32. Vázquez G, Fernández-Agulló A, Gómez-Castro C, Freire MS, Antorrena G, González-Álvarez J. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. *Ind Crop Prod*. 2012; 35(1):126-34.
33. Husgafvel R, Watkins G, Linkosalmi L, Dahl O. Review of sustainability management initiatives within Finnish forest products industry companies - Translating Eu level steering into proactive initiatives. *Resour Conserv Recy*. 2013;76(0):1-11.
34. Macheix JJ, Fleuriet A. Fruit phenolics. CRC press, 1990.

35. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Compr Rev Food Sci F*. 2012; 11(2):148-73.
36. Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):840-60.
37. Morton LW, Caccetta RA-A, Puddey IB, Croft KD. Chemistry And Biological Effects Of Dietary Phenolic Compounds: Relevance To Cardiovascular Disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(3):152-9.
38. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Tech*. 2006;17(9):505-12.
39. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 2001; 72(2):145-71.
40. Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. In: Amara SG, Bamberg E, Fleischmann B, Gudermann T, Hebert SC, Jahn R, Lederer WJ, Lill R, Miyajima A, Offermanns S, Zechner R, editors. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*: Springer Berlin Heidelberg. 2007; 79-113.
41. Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(3):412-27.
42. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(2):220-35.
43. Roleira FMF, Siquet C, Orrù E, Garrido EM, Garrido J, Milhazes N. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18(16):5816-25.
44. Díaz Reinoso B, Couto D, Moure A, Fernandes E, Domínguez H, Parajó JC. Optimization of antioxidants: Extraction from *Castanea sativa* leaves. *Chem Eng J*. 2012; 203(0):101-9.
45. Vázquez G, Calvo M, Sonia Freire M, González-Alvarez J, Antorrena G. Chestnut shell as heavy metal adsorbent: Optimization study of lead, copper and zinc cations removal. *J Hazard Mater*. 2009; 172(2-3):1402-14.
46. Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2008; 91(2-3):87-95.
47. Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Sci Technol Int*. 2010; 16(3):209-16.
48. de Vasconcelos MC, Bennett RN, Quideau S, Jacquet R, Rosa EAS, Ferreira-Cardoso JV. Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Ind Crop Prod*. 2010;31(2):301-11.
49. Jia J, Zhang X, Hu Y-S, Wu Y, Wang Q-Z, Li N-N, Guo Q-C, Dong C-X. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chem*. 2009; 115(1):32-6.
50. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(5):567-75.

51. Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med*. 2004; 52(1):19-23.
52. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(2):216-26.
53. Mujic A, Grdovic N, Mujic I, Mihailovic M, Zivkovic J, Poznanovic G, Vidaković M. Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Food Chem*. 2011 ;125(3):9.
54. Harborne JB. Introduction to ecological biochemistry. Gulf Professional Publishing; 1993.
55. Silver L, Bostian K. Screening of natural products for antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9(7):455-61.
56. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4):564-82.
57. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(11):2226-35.
58. Tian F, Li B, Ji B, Zhang G, Luo Y. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT- Food Sci Technol Res*. 2009; 42(7):1289-95.
59. Raccach M. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review. *J Food Safety*. 1984; 6(3):141-70.
60. Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*. 2000; 71(1):110-6.
61. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Šolmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 306(2):530-6.
62. Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(5):992-8.
63. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; 195(3):298-308.
64. Choi H-K, Kim D-H, Kim JW, Ngadiran S, Sarmidi MR, Park CS. *Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. *J Biosci Bioeng*. 2010; 109(3):291-6.
65. Ayala F, Palla M, Di Trollo R, Mozzillo N, Ascierio PA. The role of optical radiations in skin cancer. *ISRN Dermatol*. 2013
66. Ayala F, Palla M, Di Trollo R, Mozzillo N, Ascierio PA. The role of optical radiations in skin cancer. *ISRN Dermatology*. 2013.
67. Mehrotra P, Mishra KP, Raman G, Banerjee G. Differential regulation of free radicals (reactive oxygen and nitrogen species) by contact allergens and irritants in human keratinocyte cell line. *Toxicol Mech Methods*. 2005; 15(5):343-50.
68. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(4):517-9.
69. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004; 43(5):326-35.

- 
70. Rios JL, Bas E, Recio MC. Effects of Natural Products on Contact Dermatitis. *Curr Med Chem Anti Inflamm Anti Allergy Agents*. 2005; 4(1):65-80.
71. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010; 302(2):71-83.
72. Almeida IF, Maleckova J, Saffi R, Monteiro H, Goios F, Amaral MH. Characterization of an antioxidant surfactant-free topical formulation containing *Castanea sativa* leaf extract. 2013. *Drug Dev Ind Pharm*. *In press*.
73. Lin J-Y, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48(6):866-74.
74. Almeida IF, Costa PC, Bahia MF. Evaluation of functional stability and batch-to-batch reproducibility of a *Castanea sativa* leaf extract with antioxidant activity. *AAPS PharmSciTech*. 2010; 11(1):120-5.
75. Bilal M, Shah JA, Ashfaq T, Gardazi SMH, Tahir AA, Pervez A. Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater - A review. *J Hazard Mater*. 2013; 263:322-33.
76. Demirbas A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J Hazard Mater*. 2008; 157(2):220-9.
77. O'Connell DW, Birkinshaw C, O'Dwyer TF. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresour Technol*. 2008; 99(15):6709-24.
78. Garg UK, Kaur MP, Garg VK, Sud D. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass. *J Hazard Mater*. 2007; 140(1-2):60-8.
79. Barakat MA. New trends in removing heavy metals from industrial waste water. *Arabian J*. 2011; 4(4):361-77.
80. Vázquez G, Antorrena G, González J, Doval MD. Adsorption of heavy metal ions by chemically modified *Pinus pinaster* bark. *Bioresour Technol*. 1994; 48(3):251-5.
81. Olivares M, Guzmán JA, Natho A, Saavedra A. Kraft lignin utilization in adhesives. *Wood Sci Technol*. 1988; 22(2):157-65.
82. Çetin NS, Özmen N. Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production: I. Organosolv lignin modified resins. *Int J Adhes*. 2002; 22(6):477-80.
83. Zhang W, Ma Y, Xu Y, Wang C, Chu F. Lignocellulosic ethanol residue-based lignin-phenol-formaldehyde resin adhesive. *Int J Adhes Adhes*. 2013; 40(0):11-8.
84. Hoong YB, Paridah MT, Loh YF, Jalaluddin H, Chuah LA. A new source of natural adhesive: *Acacia mangium* bark extracts co-polymerized with phenol-formaldehyde (PF) for bonding *Mempisang* (*Annonaceae* spp.) veneers. *Int J Adhes*. 2011; 31(3):164-7.
85. Pizzi A. Chapter 8 - Tannins: Major Sources, Properties and Applications. In: Belgacem MN, Gandini A, editors. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier; 2008. 179-99.
86. Marsal A, Maldonado F, Cuadros S, Elena Bautista M, Manich AM. Adsorption isotherm, thermodynamic and kinetics studies of polyphenols onto tannery shavings. *Chem Eng J*. 2012; 183(0):21-9.
87. Sundar VJ, Raghava Rao J, Muralidharan C. Cleaner chrome tanning - emerging options. *J Clean Prod*. 2002; 10(1):69-74.
-

88. Falcão L, Araújo MEM. Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. *J Cult Herit.* 2011; 12(2):149-56.
89. Subramani S, Palanisamy T, Rao J, Nair B, Thirumalachari R. Bio-tanning process for leather making. Google Patents; 2006.
90. Moure A, Conde E, Falqué E, Domínguez H, Parajó JC. Production of nutraceuticals from chestnut burs by hydrolytic treatment. *Food Rev Int.* 2014. *In press.*
91. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.
92. Alves RC, Costa AS, Jerez Ma, Casal S, Sineiro J, Núñez MJ, Oliveira MBPP. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(23):12221-9.
93. Barroso MF, Noronha JP, Delerue-Matos C, Oliveira MB. Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(9):5062-72.
94. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 1993; 19(3):141-58.
95. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1995; 6(3-4):205-28.
96. Knight J. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci.* 1995; 25(2):111-21.
97. Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira IC. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(1):99-106.
98. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999; 299:15-27.
99. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 920.153 International (17th ed.). 2000.
100. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 928.08 International (17th ed.). 2000.
101. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 991.36 International (17th ed.). 2000.
102. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 985.29 International (17th ed.). 2000.
103. Alves RC, Casal S, Alves MR, Oliveira MB. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem.* 2009; 114(1):295-9.
104. Pimentel FB, Alves RC, Costa AS, Fernandes TJ, Torres D, Almeida MF, Oliveira MBPP. Nutritional composition of low protein and phenylalanine-restricted dishes prepared for phenylketonuric patients. *LWT-Food Sci Technol.* 2014;57(1):283-9.
105. Clinical Laboratory and Standard Institute, C.L.S.I., 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard – Sixth Edition, M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.
106. Clinical Laboratory Standards Institute, C.L.S.I., 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.

107. Nawaz H, Shi J, Mittal GS, Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Sep Purif Technol.* 2006; 48(2):176-81.
108. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - Engineering and technology. *Food Ver Int.* 2005;21(1):139-66.
109. Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Duroux JL. *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study. *J Agric Food Chem.* 2004; 53(2):282-8.
110. Moure A, Conde E, Falqué E, Domínguez H, Parajó JC. Production of nutraceuticals from chestnut burs by hydrolytic treatment. *Food Res Int.* 2014. *In press.*
111. Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(7):2326-31.
112. Albuquerque TG, Santos F, Sanches-Silva A, Oliveira MB, Bento AC, Costa HS. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chem.* 2014. *In press.*
113. Vázquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, González-Álvarez J, Antorrena G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Ind Crop Prod.* 2008; 28(3):279-85.
114. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVP, Nunes MA, Cunha LM, Oliveira MBPP. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Ind Crop Prod.* 2014; 53(0):350-7.
115. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmento B, Amaral MH, Oliveira MB. *Medicago* spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Ind Crop Prod.* 2013; 49(0):634-44.
116. Hasnaoui N, Wathelet B, Jiménez-Araujo A. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chem.* 2014; 160(0):196-203.
117. Lorenzo JM, González-Rodríguez RM, Sánchez M, Amado IR, Franco D. Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage "chorizo". *Food Res Int.* 2013; 54(1):611-20.
118. Peschel W, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzía I, Jiménez D, Lamuela-Raventós R, Buxaderas S, Codina C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 2006; 97(1):137-50.
119. Balboa EM, Soto ML, Nogueira DR, González-López N, Conde E, Moure A, Vinardell MP, Mitjans M, Domínguez H. Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics. *Ind Crop Prod.* 2014; 58(0):104-10.
120. Selani MM, Brazaca SGC, dos Santos Dias CT, Ratnayake WS, Flores RA, Bianchini A. Characterisation and potential application of pineapple pomace in an extruded product for fibre enhancement. *Food Chem.* 2014;163(0):23-30.
121. Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr Res.* 2013; 33(10):811-6.



122. Faruk O, Bledzki AK, Fink H-P, Sain M. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Prog Polym Sci.* 2012; 37(11):1552-96.
123. Alves RC, Casal S, Oliveira MBPP. Tocopherols in espresso coffee: Analytical method development and validation. *Food Chem.* 2009; 115(4):1549-55.
124. Berg H, Turner C, Dahlberg L, Mathiasson L. Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk. *J Biochem Biophys Methods.* 2000; 43(1-3):391-401.
125. Kornsteiner M, Wagner KH, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem.* 2006; 98(2):381-7.
126. Pereira SE. Caracterização da pele de prata no contexto da valorização de subprodutos da indústria agro-alimentar (Master Thesis in Quality Control). Department of Bromatology. University of Porto, Porto (2012). Available at: <http://repositorio.up.pt/>.
127. Morais JM, Burgess DJ. *In vitro* release testing methods for vitamin E nanoemulsions. *Int J Pharm.* 2014; 475(1–2):393-400.
128. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009 2009; 37(1):1-17.
129. FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series N° 724, 116–129. 1985.
130. Vidotti RM, Viegas EMM, Carneiro DJ. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Sci Tech.* 2003; 105(1-4):199-204.
131. Rondanelli M, Opizzi A, Antoniello N, Boschi F, Iadarola P, Pasini E, et al. Effect of essential amino acid supplementation on quality of life, amino acid profile and strength in institutionalized elderly patients. *Clin Nutr.* 2011; 30(5):571-7.
132. Ministério da Agricultura e do Mar, Estratégia de Adaptação da Agricultura e das Florestas às Alterações Climáticas. Governo de Portugal. 2011.